

**DIE Na-K-ATPase IN NIERENRINDE UND
ÄUSSEREM MARK BEI DER EXPERIMENTELLEN
THERAPIE DER CHRONISCHEN HARNSTAUUNGSNIERE
UNTERSUCHUNGEN AN BEAGLE - HUNDEN
NACH VIERWÖCHIGER KOMPLETTER
UNILATERALER URETEROBSTRUKTION**

THOMAS STRAUB

1988

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Klinikum Großhadern
(Vorstand: Prof. Dr. E. Schmiedt)

Die Na-K-ATPase in Nierenrinde und äußerem Mark bei der
experimentellen Therapie der chronischen Harnstauungsniere
Untersuchungen an Beagle-Hunden nach vierwöchiger
kompletter unilateraler Ureterobstruktion

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Straub
aus Marktoberdorf

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Sturm

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Schmiedt

Prof. Dr. Dr. C. Hammer

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 07. 1988

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methodik	9
2.1.	Versuchsgruppen	9
2.2.	Nierenfunktionsuntersuchungen	10
2.2.1.	Versuchsanordnung	10
2.2.2.	Operatives Vorgehen	10
2.2.2.1.	Ureterligatur	10
2.2.2.2.	Ureterhautfistel	11
2.2.2.3.	Nephrektomie	11
2.2.3.	Renale Inulin- und PAH-Clearance	11
2.2.4.	Bestimmung von Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff und Osmolalität in Serum und Urin	12
2.3.	Gewebeuntersuchungen	13
2.3.1.	Verwendung des Nierengewebes	13
2.3.2.	Herstellung des Gewebehomogenates zur Messung der Na-K-ATPase und des Harnstoffgehaltes	13
2.3.3.	Bestimmung der Aktivität der Na-K-ATPase	15
2.3.4.	Bestimmung der Ouabainbindungsstellen im Nierengewebe	16
2.3.4.1.	Versuchsdurchführung	16
2.3.4.2.	Berechnung der Ouabainbindungsstellen	18
2.3.5.	Harnstoffkonzentration im Nierengewebe	22
2.3.6.	Natrium- und Kaliumkonzentration im Nierengewebe	22
2.3.7.	Gewebeosmolalität	22
2.4.	Statistik	22
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Aktivität der Na-K-ATPase	23
3.2.	Ouabainbindungsstellen	24
3.3.	Enzymeigenschaften	26
3.4.	Ausscheidungsfunktion	28
3.4.1.	Kaliumausscheidung	28
3.4.2.	Natriumausscheidung	29
3.4.3.	Harnzeitvolumen	31
3.4.4.	Urin-osmolalität	31
3.4.5.	Harnstoffausscheidung	32
3.4.6.	Gewebeosmolalität	32
3.4.7.	Regressionsgeraden	33
3.4.7.1.	Inulin-clearance - Ouabainbindungsstellen	33
3.4.7.2.	Natriumload (Kaliumload) - Ouabainbindungsstellen	34
3.4.7.3.	Urin-osmolalität - Ouabainbindungsstellen (Enzymaktivität)	36
3.4.7.4.	Urin-osmolalität - Gewebeosmolalität	38
3.4.7.5.	Ouabainbindungsstellen (Enzymaktivität) - Gewebeosmolalität	39
4.	Diskussion	41
4.1.	Diskussion der Ergebnisse	41
4.1.1.	Na-K-ATPase	41
4.1.2.	Harnzeitvolumen	42
4.1.3.	Urin-osmolalität	42

4.1.4.	Elektrolyt- und Harnstoffausscheidung	42
4.2.	Diskussion der gefundenen Ergebnisse unter Berücksichtigung pathophysiologischer Aspekte	43
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	50

1. Einleitung

Eine Harnstauung ist ein im klinischen Alltag häufig zu erhebender Befund. Neben den Harnleitersteinen zählen Tumoren des Harnleiters oder benachbarter Organe zu den häufigsten Ursachen.

Untersuchungen von Büttner und Wieland (1986) zeigen, daß nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten Harnstauung eine funktionslose Niere zurückbleibt. Bei kürzer dauernden Obstruktionsperioden kommt es nach deren Auflösung zu einer graduellen Erholung der Nierenfunktion. Eine verminderte osmotische Konzentrationsfähigkeit geht mit einer reduzierten Na-K-ATPase-Aktivität im äußeren Mark der Niere einher (Abb. 1). Parallel zur reduzierten Na-K-ATPase-Aktivität und osmotischen Konzentrationsfähigkeit findet sich ein deutlich gesteigerter Elektrolytverlust (Abb. 2; Martinez-Maldonado et al. 1969, 1970; Williams et Fanestil 1976; Wilson et al. 1978). Das Ausmaß der Regeneration der Na-K-ATPase-Aktivität nach Aufhebung einer Harnstauung entspricht in etwa dem der Erholung der Nierenfunktion (Büttner 1986).

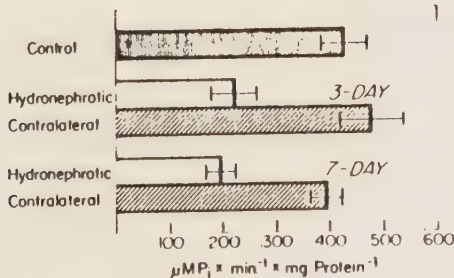


Abb. 1: Die Aktivität der Na-K-ATPase in Hundenieren nach drei-, bzw. siebentägiger kompletter einseitiger Harnstauung (Williams et Fanestil 1976).

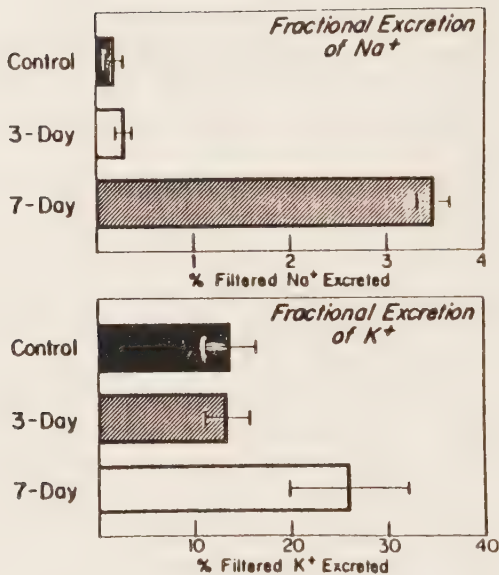


Abb. 2: Die fraktionelle Natrium-, bzw. Kaliumausscheidung nach drei-, bzw. siebentägiger kompletter unilateraler Harnstauung (Williams et Fanestil 1976).

Ungefähr zwei Stunden nach Auftreten einer Harnstauung kommt es zu einem Anstieg des renalen Blutflusses. Durch erhöhte Renin- und Prostaglandin-E₂-Synthese entsteht eine myogen vermittelte Vasodilatation. Eine sechs bis acht Stunden postobstruktiv auftretende zunehmende präglomeruläre Vasokonstriktion führt zu einer Reduzierung der renalen Durchblutung auf 37% des Ausgangswertes (Moody 1975). Hierdurch kommt es zu einem deutlichen Absinken der glomerulären Filtrationsrate. Diese Mechanismen führen dazu, daß nach vierwöchiger kompletter Harnstauung eine funktionslose Niere zurückbleibt (Abb. 3). Die Engstellung der präglomerulären Gefäße ist Thromboxan-A₂ vermittelt und durch Imidazol hemmbar (Morrison et al. 1977). Die Gabe von Tolazoline, ein 2-Benzyl-2-Imidazol-Hydrochlorid, nach

Entlastung einer Harnstauung führt zu einer Aufhebung des präglomerulären Vasospasmus und zu einer weitgehenden Wiederherstellung der physiologischen Durchblutungsverhältnisse (Huland 1983).

Pathophysiologie der Harnstauung

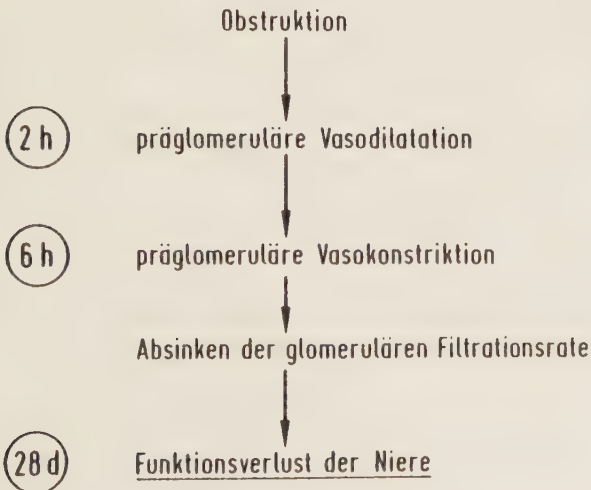


Abb. 3: Pathophysiologie der Harnstauung (Sturm 1986)

Ebenso führt die Verabreichung von Tolazoline unmittelbar nach Aufhebung einer vierwöchigen Ureterligatur zu einer deutlichen Verbesserung der postobstruktiven Nierenfunktion (Sturm 1986).

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, inwieweit die verbesserte osmotische Konzentrationsfähigkeit nach Therapie mit Tolazoline mit der Aktivität der Na-K-ATPase und der Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Nierenmark korreliert und welchen Anteil das Enzym an der Erholung der Ausscheidungsfunktion hat.

2. Material und Methodik

2.1. Versuchsgruppen

Für die Versuche wurden weibliche Beagles mit einem Körpergewicht von 9-17 kg verwendet. Sechs Tiere wurden unmittelbar nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten unilateralen Harnstauung mit einer einmaligen Dosis Tolazoline von 5 mg/kg Körpergewicht intravenös behandelt. Fünf Kontrolltiere wurden nach Entlastung der Ureterobstruktion keiner weiteren Therapie unterzogen.

Die PAH- und Inulin-Clearance, die Natrium- und Kaliumkonzentration in Plasma und Urin, die Harnstoffkonzentration im Urin, sowie die Urinosmolalität dienten als Parameter für die Nierenfunktion. Vor der Ligatur, sofort nach Fistelung und anschließend in ein-, später zweiwöchentlichem Abstand wurde die seitengetrennte Nierenfunktion bestimmt. Sämtliche Versuche wurden nach zwanzigstündiger Wasser- und Nahrungskarenz durchgeführt.

Aus dem Natriumsalz der PAH-Säure (Fa. Serva, Feinbiochemie, Heidelberg) wurde die PAH-Lösung hergestellt und mit Zitronensäure auf pH = 7 abgepuffert. Inulin wurde als 10%ige pyrogenfreie Lösung von der Firma Laevosan CoKg, Linz Donau, Österreich gekauft.

Die Harnstoffkonzentration wurde mit der Urease-Berthelod-Reaktion mittels eines Test-Kits der Fa. Boehringer, Mannheim ermittelt.

^3H -Ouabain (spezifische Aktivität 18 Ci/mmol) wurde von der Fa. New England Nuclear, Dreieich erworben.

Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von Boehringer Mannheim oder Merck Darmstadt erworben.

2.2. Nierenfunktionsuntersuchungen

2.2.1. Versuchsanordnung

Die Tiere wurden zunächst mit Pentobarbital (20 mg/kg Körpergewicht Nembutal®, Fa. Abbott, Ingelheim) narkotisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden Einzeldosen von 5 mg Pentobarbital je nach Bedarf nachinjiziert. Zum Freihalten der Atemwege wurde ein Endotrachealtubus (6-8 Charriere) gelegt. Die Tiere atmeten dabei spontan. An einem der Vorderläufe erfolgte über einen venösen Verweilkatheter (Abbocath® 18-20 G, Fa. Venisystems) die Zufuhr von Pentobarbital, PAH, Inulin und Tolazoline. Zur Entnahme von Blutproben wurde eine Vena jugularis externa mittels eines Verweilkatheters kanüliert.

Um den von der kontralateralen linken Niere produzierten Urin messen zu können, wurde in die Harnblase ein Dauerkatheter (12-14 Charriere) eingelegt. Urinproben der rechten Niere wurden mittels einer armierten pädiatrischen Ernährungs-sonde (5-7 Charriere, Fa. Mallinckrodt) direkt aus dem Nierenbecken entnommen.

2.2.2. Operatives Vorgehen

2.2.2.1. Ureterligatur

Unter sterilen Kautelen wurde das Abdomen durch eine mediane Unterbauchlaparotomie eröffnet. Nach Aufsuchen des rechten Ureters wurde dieser ungefähr 2 cm oberhalb der Einmündung in die Blase mit 2-0 Vicryl doppelt ligiert. Sofort im Anschluß daran wurde der Ureter etwas proximal der Ligatur inzidiert und mittels einer armierten Kinderernährungs-sonde (Charriere 5), die bis in das Nierenbecken vorgeschoben wurde, kanüliert. Nach Beendigung der Clearancemessung wurde die Sonde entfernt und der Ureter mit 2-0 Vicryl doppelt unterbunden. Das Peritoneum wurde mit einer forlaufenden Naht (2-0 Catgut), Faszie und Haut mit Einzelknopfnähten (3-0 Vicryl, bzw. 4-0 Seide) verschlossen.

2.2.2.2. Ureterhautfistel

Nach der vierwöchigen Harnstauung wurde bei einer erneuten Laparotomie der Ureterstumpf aufgesucht und freipräpariert. Nach dessen Eröffnung wurde ein passender Katheter eingeführt und bis in das Nierenbecken vorgeschoben. Nach Durchführung der Clearance-Messung wurde ein Ureterocutaneostoma nach der Technik von Toyoda (1977) angelegt. Hierbei wird der Ureter soweit freipräpariert, daß er sich spannungsfrei durch eine weit aufgespreizte Bauchwandlücke nach epikutan verlagern läßt. Der überstehende Ureterstumpf wird seitlich so eingeschnitten, daß zwei rechteckige Lappen entstehen. An der Fistelöffnung wird ein den Lappen entsprechendes Stück Epidermis abpräpariert und beide Lappen werden cutan eingenäht. Anschließend erfolgt der schichtweise Verschuß des Abdomens.

2.2.2.3. Nephrektomie

Nach fünfzehnwöchiger Beobachtungszeit wurden die Tiere beidseitig nephrektomiert. Hierzu wurde nach erneuter medianer Laparotomie jeweils der Nierenstiel dargestellt. Nach Entnahme der Nieren wurden diese sofort auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Tiere durch eine Injektion von 20 mval KCl getötet.

2.2.3. Renale Inulin- und PAH-Clearance

Die Inulin- und PAH-Clearance wurden, modifiziert nach der von Richterich (1971) beschriebenen Methode, simultan bestimmt. Zunächst wurden ein Bolus von 18 ml einer 10%igen Inulinlösung und 3,5 ml einer 2%igen Natriump-Amino-Hippurat-Lösung verabreicht. Zur Aufrechterhaltung konstanter Plasmaspiegel wurde ein Gemisch, bestehend aus 32 ml einer Inulinlösung (10%ig), 3ml einer Natriump-Amino-Hippurat-Lösung (20%ig) und 185 ml physiologischer Kochsalzlösung mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 30 ml/h über einen Perfusor (Fa. Braun, Melsungen) verabreicht.

Untersuchungen von Büttner (1986) zeigen, daß die hiermit erzielten PAH-Plasmakonzentrationen deutlich unter dem tubulären Transportmaximum für PAH liegen. Dies gilt selbst für die durch eine Harnstauung geschädigten Nieren. So ist zu erwarten, daß die für die PAH-Clearance ermittelten Werte tatsächlich die tubuläre Funktion repräsentieren und nicht durch eine zusätzliche Filtration von PAH verfälscht sind.

Nach einer dreißigminütigen Aquilibrierungsphase wurde über eine Stunde seitengetrent der Urin gesammelt. Während der Sammelperiode wurde in Abständen von jeweils zwanzig Minuten ca. 1,5 ml Blut zur Bestimmung des Inulin- und PAH-Spiegels entnommen.

Die PAH-Konzentration wurde mit der Brattan-Marshall-Reaktion (Deetjen 1963), die Inulin-Konzentration mit der Anthron-Methode (Heinsberg 1960; Richterich 1971) bestimmt. Die bei obigen Reaktionen entstehenden Farbstoffkomplexe haben eine spezifische Absorption für PAH bei 546 nm und für Inulin bei 578 nm. Die renale Clearance ergibt sich aus dem Produkt der Extinktion im Urin und dem Harnzeitvolumen, geteilt durch die mittlere Extinktion im Serum während der Sammelperiode.

$$\text{Clearance (ml/min)} = \frac{E_u \times \text{Urinvolumen (ml/min)}}{E_s}$$

E_u = Extinktion im Urin

E_s = mittlere Extinktion im Serum

2.2.4. Bestimmung von Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff und Osmolalität in Serum und Urin

Für die Bestimmung der Konzentration von Natrium, Kalium, Kreatinin und Harnstoff, sowie der Osmolalität in Serum und Urin wurden Blut-, bzw. Urinproben vor Infusion von PAH und Inulin verwendet. Die Blutproben wurden 3 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 3200) und das Plasma abpipettiert. Die Natrium- und Kaliumkonzentration in Plasma und Urin wurde flammenphotometrisch (FCM 6143 Fa. Eppendorf, Hamburg) be-

stimmt. Die Kreatininkonzentration wurde mittels eines Test-Kits der Fa. Boehringer, Ingelheim bestimmt. Die Harnstoffkonzentration wurde mit der Urease-Berthelod-Reaktion (Test-Kit der Fa. Boehringer, Mannheim) bestimmt, die Osmolalität mit einem Digitalosmometer der Fa. Vogel, Gießen.

2.3. Gewebeuntersuchungen

2.3.1. Verwendung des Nierengewebes

Sowohl die gestaute, als auch die kontralaterale Niere wurden bei jedem Tier bei intakter Durchblutung freigelegt. Nach Abklemmen der Gefäße wurden die Nieren sofort entnommen und auf Eis abgekühlt. Nach Entfernen der Nierenkapsel wurden die Nieren gewogen und mittels einer Präparierschere bei 0°C in Rinde, äußeres und inneres Mark aufgeteilt. Zur Messung der Na-K-ATPase und des Harnstoffgehaltes wurden Proben von Rinde, äußerem und innerem Mark in Zentrifugenröhrchen gefüllt (2 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) und bis zu deren Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Zur Bestimmung des Wasser-, sowie des Natrium- und Kaliumgehaltes wurden jeweils Proben von ca. 300 mg in trockene, elektrolytfreie Wägegläschen gegeben und gewogen. Nach achtundvierzigstündigem Trocknen im geöffneten Wägegläschen bei 110°C und erneutem Wiegen wurden die Gewebeproben in elektrolytfreien Schalen gemörsert (Abb. 4).

2.3.2. Herstellung des Gewebehomogenates zur Messung der Na-K-ATPase und des Harnstoffgehaltes

Nach dem Auftauen des Nierengewebes wurde das Feuchtgewicht bestimmt. Jeweils ungefähr 1 g der Probe wurde mit einer Schere grob zerkleinert und in 15 ml 0,25 M Saccharose - 1 mM EDTA-Puffer suspendiert. Nach Homogenisierung mit einem Glas-Teflon-Homogenisator (Potter, Fa. Braun, Melsungen) mit 800 Umdrehungen pro Minute bei 0°C wurde das Homogenat bei 0°C 3 Minuten mit 100 Watt Ultraschall behandelt (Labsonic 1510, Fa. Braun, Melsungen), um es weiter aufzuschließen. Nach dem Wiegen des Homogenates wurde es bei 0°C 15 Minuten bei 27000 g zentrifugiert (Sorvall In-

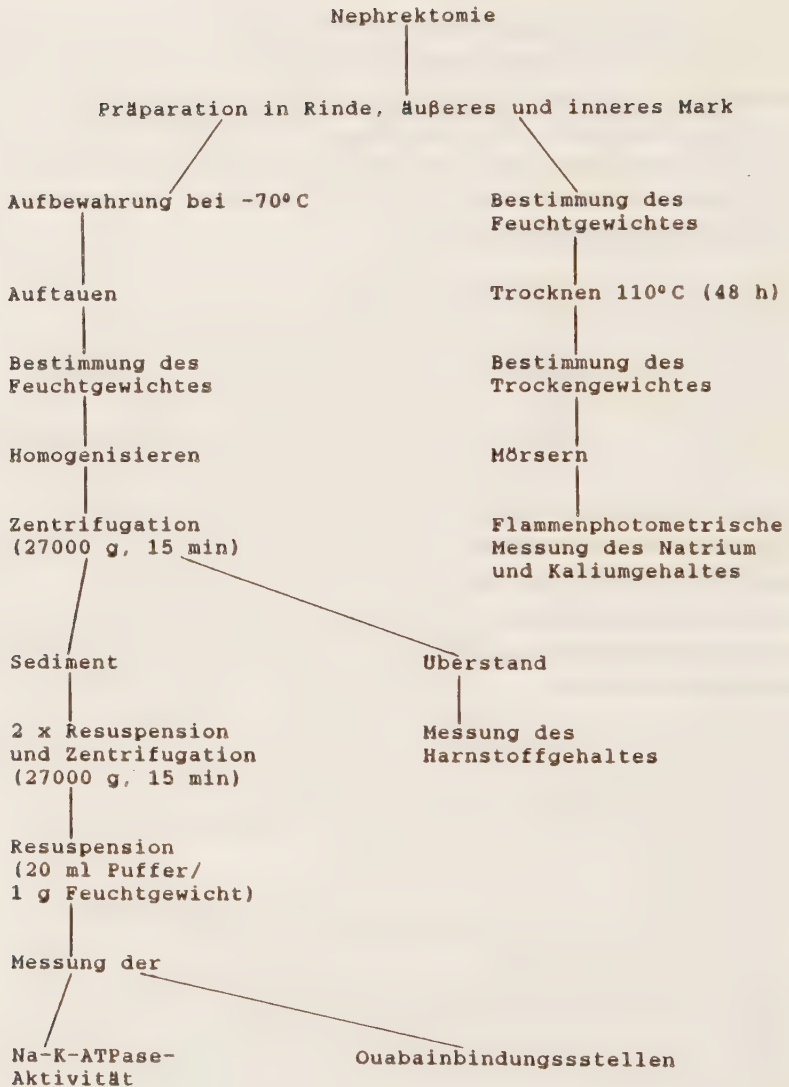
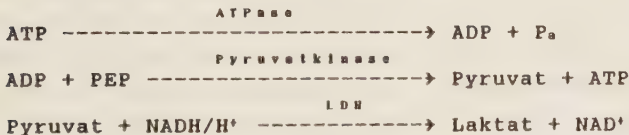


Abb. 4: Aufbereitung des Nierengewebes zur Messung der Na-K-ATPase-Aktivität, der Anzahl der Ouabainbindungsstellen, sowie des Elektrolyt- und Harnstoffgehaltes

struments, Rotor SS 34). Der Überstand wurde zur Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Gewebe verwendet (2.3.5.). Das Sediment wurde in 15 ml 0,25 M Saccharose - 1 mM EDTA-Puffer mit einem Glas-Teflon-Potter resuspendiert und erneut bei 0°C bei 27000 g 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 20 ml 0,25 M Saccharose - 1 mM EDTA-Puffer pro Gramm Feuchtgewicht des eingesetzten Gewebes mit einem Glas-Teflon-Homogenisator resuspendiert. Der Proteingehalt des Homogenates wurde mit Rinderserumalbuminlösung (5%) als Standard bestimmt (Lowry et al. 1951, Abb. 4).

2.3.3. Bestimmung der Aktivität der Na-K-ATPase

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe eines gekoppelten optischen Assays (Schner et al. 1967). In diesem Ansatz wird durch die ATPase ATP zu ADP und anorganischem Phosphat hydrolysiert, wobei NADH zu NAD im Verhältnis eins zu eins oxidiert wird. Hierbei sind folgende Reaktionen aneinander gekoppelt.



Zunächst wird ATP durch die ATPase in ADP und anorganisches Phosphat (P_i) umgesetzt. In einem weiteren Reaktionsschritt wird aus dem in der ersten Reaktion entstandenen ADP mittels Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase (PK) Pyruvat und ATP gebildet. In einer dritten Reaktion katalysiert die Laktatdehydrogenase (LDH) die Reduktion des Pyruvat zu Laktat in stöchiometrischem Verhältnis zur Oxidation von NADH zu NAD. Das Reaktionsmedium enthält sämtliche eingesetzten Substanzen im Überschuß, so daß die Aktivität der Na-K-ATPase den die Reaktionsgeschwindigkeit limitierenden Faktor darstellt. Die Änderung der NADH-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 334 nm

(Eppendorphotometer 1101 M) kontinuierlich gemessen und mittels eines Kompensationsschreibers (Eppendorf 6511) registriert. Die Enzymaktivität errechnet sich nach folgender Formel:

$$A = \frac{\Delta E \times V}{e \times v}$$

ΔE = Extinktionsänderung pro Minute und Zentimeter Küvettenlänge, V = gesamtes Reaktionsvolumen (ml), v = einpipettiertes Homogenat (ml), e = Extinktionskoeffizient (U^{-1}).

Die Aktivitätsmessung erfolgte bei 37°C in Glasküvetten mit einer Innenweite von einem Zentimeter. Die ATPase-Testlösung enthielt 100 mM Imidazol, 150 mM Natriumchlorid, 100 mM Ammoniumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 5 mM ATP, 2,5 mM Phosphoenolpyruvat, 0,5 mM NADH, 6 U Laktatdehydrogenase und 6 U Pyruvatkinase. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml des Homogenates zu 1,5 ml der ATPase-Testlösung gestartet. In einer weiteren Küvette wurde die Aktivität der unspezifischen ATPasen, im wesentlichen der Mg-ATPase, bestimmt, nachdem zuvor durch Zugabe von 0,1 ml $10^{-2}M$ Ouabainlösung die Na-K-ATPase vollständig gehemmt wurde. Aus der Differenz der Gesamtaktivität und der Aktivität der unspezifischen ATPasen ergibt sich die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase. Sie wurde als Enzymaktivität pro Gramm eingesetztes Feuchtgewebe und als Enzymaktivität pro Gramm Proteingehalt des Homogenates berechnet (Abb. 5).

2.3.4. Bestimmung der Ouabainbindungsstellen im Nierengewebe

2.3.4.1. Versuchsdurchführung

Da Ouabain spezifisch an die Na-K-ATPase bindet, kann aus der konzentrationsabhängigen Bindung die Dissoziationskonstante (K_D) des Ouabain-Na-K-ATPase-Komplexes, sowie die Anzahl der Ouabainbindungsstellen der im Reaktionsgemisch

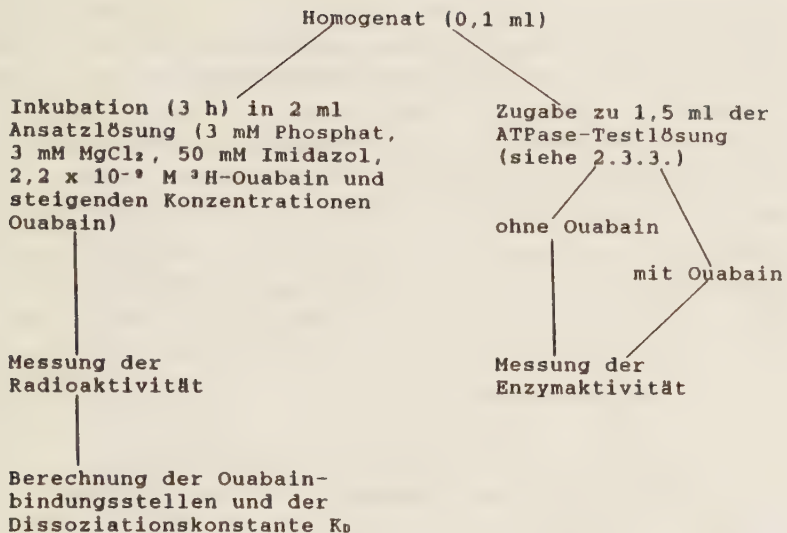


Abb. 5: Verwendung des Gewebehomogenats

vorhandenen Nierenzellmembranen bestimmt werden (Scatchard 1949). Der Reaktionsansatz enthielt 0,1 ml des Homogenats, 3 mM Magnesiumchlorid, 3 mM Phosphat, 50 mM Imidazol, 2,2 nM ³H-Ouabain und ansteigende Konzentrationen (0, 1, 3, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40, 60, 100, 200, 400 nM) nicht markiertes Ouabain bei einem Gesamtvolumen von 2 ml (Abb. 5). Er wurde in Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Fa. Christ, Osterode/Harz) mit einem Fassungsvermögen von 10 ml drei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Büttner (1986) zeigte, daß bei einer Inkubationszeit von mehr als 120 Minuten ein Maximum der Bindung von Ouabain an die Na-K-ATPase erreicht ist und dieses Niveau bei längeren Inkubationsperioden erhalten bleibt. Deswegen wurde eine Inkubationszeit von drei Stunden gewählt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde bei einer Ouabainkonzentration von 10⁻³ M in einem Dreifachansatz bestimmt. Ebenso dreimal gemessen wurde die Radioaktivität des im Ansatz enthaltenen ³H-Ouabain. Die Mittelwerte wurden für die Berechnungen verwendet. Die Reaktion wurde

durch Zugabe von kaltem aqua bidest. (0°C) gestoppt. Durch Schnellfiltration über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) mittels des Soges einer Wasserstrahlpumpe wurde gebundenes von freiem Ouabain abgetrennt. Die Reaktionsgefäße wurden zweimal mit aqua bidest. gespült, ebenso der Filteraufsatz. Nach dem Trocknen der Filterplättchen (20 Minuten bei 100°C) wurden diese in Szintillationsröhrchen eingebracht, welche mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501, Zinsser Analytic) gefüllt wurden. Nach Abkühlen auf 15°C wurde die Radioaktivität in einem Betacounter (Packard Tri-carb 2660) in Counts pro Minute (cpm) gemessen. Die Zählzeit pro Röhrchen betrug 4 Minuten.

2.3.4.2. Berechnung der Ouabainbindungsstellen

Zunächst wurde das insgesamt an die Na-K-ATPase gebundene Ouabain (b) nach folgender Formel berechnet:

$$b = \frac{\text{cpm} - \text{cpm}_{\text{unspezifisch}}}{\text{cpm}_{\text{max}}} \times \text{Ouabain}_{\text{gesamt}} \times C$$

Man subtrahiert von der Aktivität der jeweiligen Probe (cpm) die unspezifisch gebundene Radioaktivität ($\text{cpm}_{\text{unspezifisch}}$) und dividiert das Ergebnis durch die insgesamt eingesetzte Radioaktivität (cpm_{max}). Das so entstandene Bindungsverhältnis wird mit der Menge des insgesamt eingesetzten Ouabain ($\text{Ouabain}_{\text{gesamt}}$) und einer Konstanten C multipliziert. Der so gewonnene Wert entspricht dem an die Na-K-ATPase gebundenen Ouabain (b). $\text{Ouabain}_{\text{gesamt}}$ setzt sich zusammen aus der Menge des tritiummarkierten (^3H -Ouabain) und des nicht markierten Ouabain ($\text{Ouabain}_{\text{gesamt}} = ^3\text{H}\text{-Ouabain} + \text{Ouabain}$). Subtrahiert man das gebundene Ouabain (b) vom insgesamt eingesetzten Ouabain ($\text{Ouabain}_{\text{gesamt}}$), so erhält man das freie, d.h. abfiltrierte Ouabain (f).

$$f = \text{Ouabain}_{\text{gesamt}} - b$$

OUABAIN-BINDUNG AN DEN OUABAIN-REZEPTOR

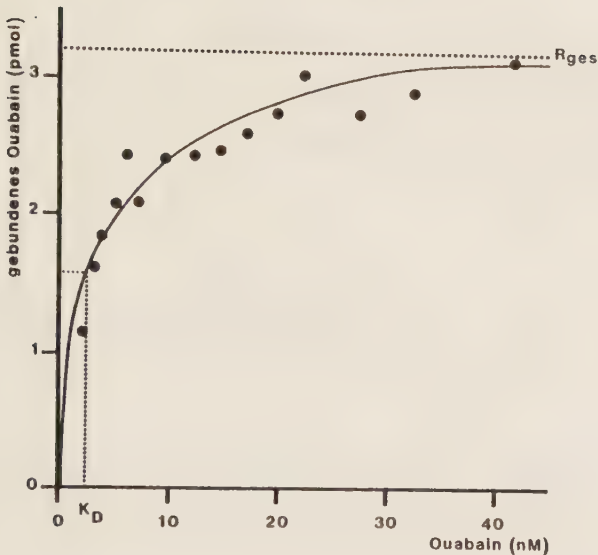


Abb. 6: Graphische Bestimmung von K_D , indem die Menge des insgesamt eingesetzten Ouabains (nM) gegen das gebundene Ouabain (pmol) aufgetragen wird. Die Dissoziationskonstante K_D entspricht der Ouabainkonzentration, bei der die Hälfte der Ouabainrezeptoren besetzt ist.

Trägt man das gebundene Ouabain (b) gegen das insgesamt eingesetzte Ouabain (Ouabain_{gesamt}) auf, so erhält man eine Kurve, die logarythmisch ansteigt (Abb. 6) und sich asymptotisch dem Wert R_{gesamt} annähert. R_{gesamt} entspricht der Zahl der insgesamt vorhandenen Rezeptormoleküle, d.h. Na-K-ATPase-Moleküle. Die Dissoziationskonstante K_D , ein Maß für die Affinität des Ouabain-Na-K-ATPase-Komplexes, läßt sich graphisch bestimmen. Sie entspricht der Ouabainkonzentration, bei der die Hälfte der Rezeptoren besetzt ist.

Die Ouabainbindung an den Rezeptor (Na-K-ATPase) folgt dem Massenwirkungsgesetz. Die Reaktionsgleichung lautet:



O = Ouabain; R = freie Rezeptoren = Na-K-ATPase-Moleküle;
OR = Ouabain-Rezeptor-Komplex

Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich für K_D folgende Gleichung:

$$K_D = \frac{O \times R}{OR}$$

$R = R_{\text{gesamt}} - OR$. Daraus ergibt sich für K_D :

$$K_D = \frac{O \times (R_{\text{gesamt}} - OR)}{OR}$$

In obiger Gleichung entspricht OR dem gebundenen Ouabain (b), O dem freien Ouabain (f) und R_{gesamt} den insgesamt vorhandenen Na-K-ATPase-Molekülen. Es ergibt sich folgende Gleichung:

$$K_D = \frac{f \times (R_{\text{gesamt}} - b)}{b}$$

Formt man die Gleichung nach Scatchard (1949) um

$$b = - \frac{b}{f} \times K_D + R_{\text{gesamt}}$$

und stellt diese Funktion graphisch dar (Abb. 7), so ergibt sich eine Gerade, falls nur ein Rezeptor mit einer einheitlichen Affinität zum Ouabain vorhanden ist. Dies war bei den vorliegenden Untersuchungen stets der Fall. Die Steigung der Geraden entspricht K_D , d.h. der Affinität des Ouabain-Rezeptor-Komplexes. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate entspricht R_{gesamt} , d.h. den insgesamt im Ansatz vorhandenen Rezeptor (Na-K-ATPase)-Molekülen.

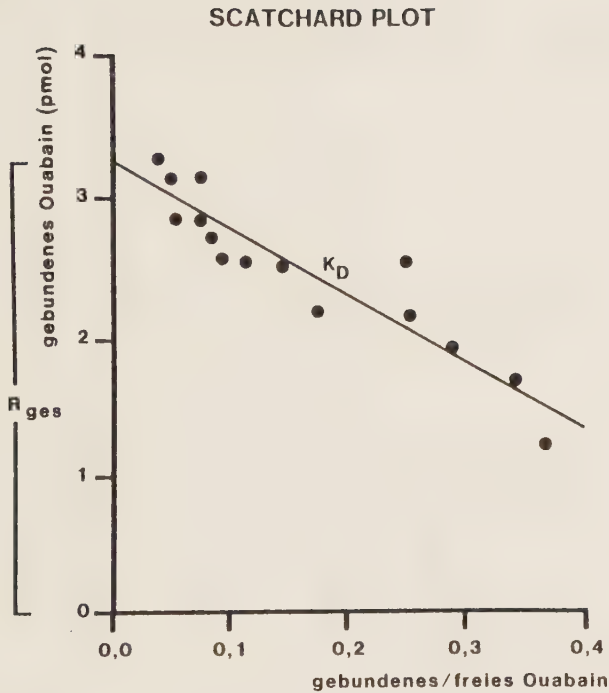


Abb. 7: "Scatchard Plot" zur graphischen Bestimmung von K_D und R_{gesamt} , indem man das Verhältnis von gebundenem zu freiem Ouabain gegen das gebundene Ouabain aufträgt.

2.3.5. Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Nierengewebe

Im Überstand des Gewebehomogenates (siehe 2.3.2.) wurde die Harnstoffkonzentration photometrisch bei 546 nm mit der Urease-Berthelod-Reaktion (Test-Kit der Fa. Böhringer, Mannheim) bestimmt. Der Harnstoffgehalt wurde nach folgender Formel berechnet (Büttner 1986):

$$G_{Hst} = \frac{\left(\frac{m_a - m_f}{d_p} + m_f \times G_{H_2O} \right) \times C_{Hst} \times 10^3}{m_f}$$

G_{Hst} = Harnstoffkonzentration im Gewebe in mmol/kg; m_a = Masse des Homogenates in Gramm; m_f = Masse des Feuchtgewebes in Gramm; d_p = Dichte des Puffers in g/ml; G_{H_2O} = Wassergehalt der Gewebeprobe; C_{Hst} = Harnstoffgehalt im Überstand in mmol/l.

2.3.6. Natrium- und Kaliumkonzentration im Nierengewebe

Der Natrium- und Kaliumgehalt wurde in trockenen Gewebeproben (siehe 2.3.1.) flammenphotometrisch bestimmt (Baethmann und van Harreveld 1973). Der Elektrolytgehalt im Feuchtgewebe wurde durch Multiplikation mit (1 - Wassergehalt) bestimmt.

2.3.7. Gewebeosmolalität

Die Gewebeosmolalität wurde näherungsweise nach folgender Formel berechnet: 2 x Natriumgehalt + 2 x Kaliumgehalt + Harnstoffgehalt

2.4. Statistik

Für Vergleiche zwischen den beiden Versuchsgruppen wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwandt.

Vergleiche innerhalb einer Versuchsgruppe wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Aktivität der Na-K-ATPase

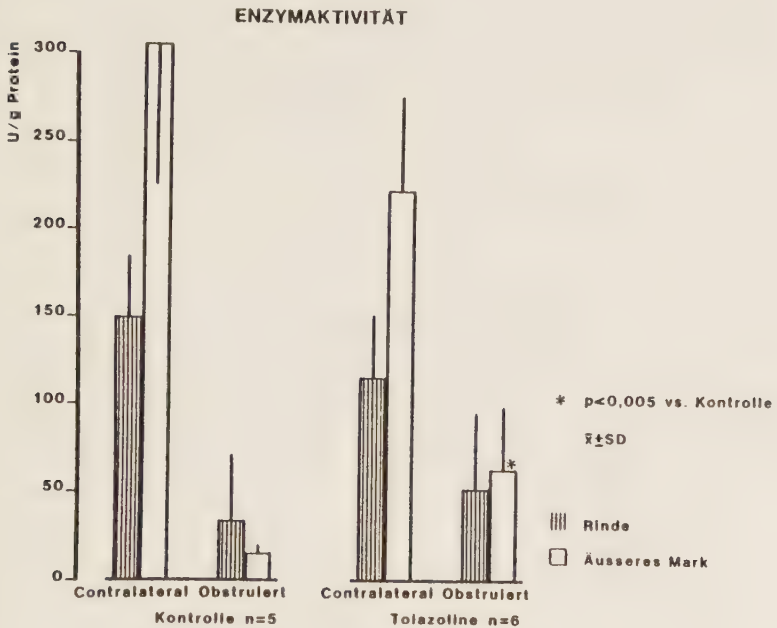


Abb. 8: Vergleich der Enzymaktivität in Nierenrinde und Äußerem Mark in den gestauten und den kontralateralen Nieren von nach Entlastung einer vierwöchigen Harnstauung mit Tolazoline behandelten Tieren und nicht therapierten Kontrolltieren.

Es findet sich im Äußeren Mark der gestauten Nieren der mit Tolazoline behandelten Tiere mit $64,4 \pm 36,2$ U/g Protein eine signifikant höhere ($p < 0,005$) Enzymaktivität, als im Äußeren Mark von gestauten und nicht therapierten Nieren mit $16,1 \pm 5,6$ U/g Protein. Im Äußeren Mark der kontralateralen Nieren von behandelten Tieren ist die Aktivität mit $224,2 \pm 53,6$ U/g Protein niedriger, als in den kon-

tralateralen Nieren von nicht behandelten Tieren mit $306,0 \pm 80,7$ U/g Protein. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Die Enzymaktivität in der Rinde der gestauten Nieren der mit Tolazoline behandelten Tiere ist mit $53,7 \pm 44,2$ U/g Protein deutlich, aber nicht signifikant höher, als mit $34,8 \pm 37,5$ U/g Protein die in der Rinde der obstruierten Nieren der nicht behandelten Tiere. In der Rinde der kontralateralen Nieren beträgt die Enzymaktivität $116,6 \pm 35,4$ U/g Protein bei den behandelten und $150,9 \pm 34,6$ U/g Protein bei den unbehandelten Tieren (Abb. 8).

3.2. Ouabainbindungsstellen

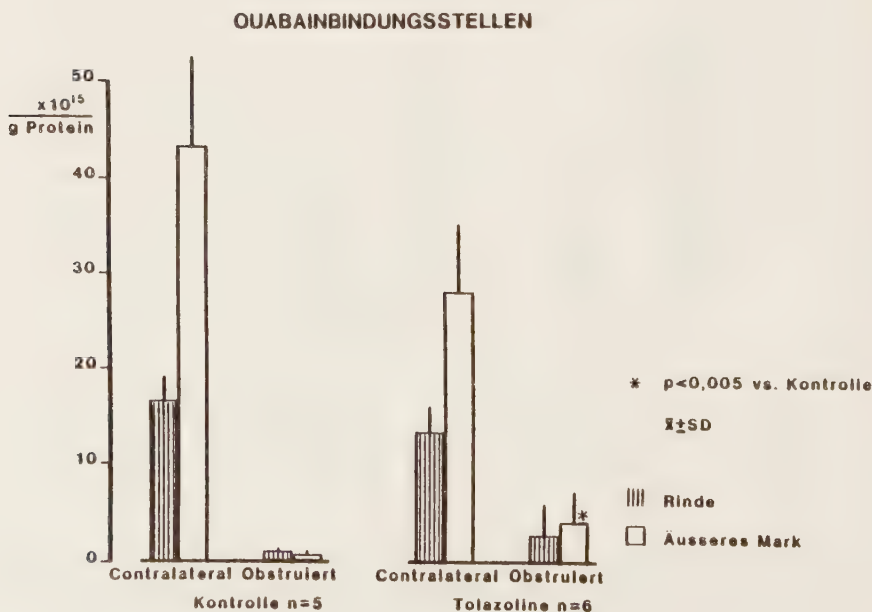


Abb. 9: Vergleich der Anzahl der Ouabainbindungsstellen in Nierenrinde und Äußerem Mark von nach Entlastung einer vierwöchigen Harnstauung mit Tolazoline behandelten und nicht behandelten Tieren in den gestauten und kontralateralen Nieren.

Parallel zum Anstieg der Enzymaktivität nimmt auch die Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Mark auf $(4,26 \pm 3,23) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein in gestauten und mit Tolazoline therapierten im Vergleich zu den nicht therapierten Nieren mit $(0,8 \pm 0,4) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein ($p < 0,005$; Abb. 9) signifikant zu. Auch in den kontralateralen Nieren der behandelten Tiergruppe ist ähnlich wie bei der Enzymaktivität die Anzahl der Ouabainbindungsstellen mit $(28,2 \pm 7,1) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein zwar nicht signifikant, aber doch deutlich niedriger, als mit $(43,4 \pm 9,3) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein bei den Kontrolltieren. Wie die Abb. 9 zeigt, findet sich auch in der Rinde der obstruierten Nieren der mit Tolazoline behandelten Tiere mit $(2,93 \pm 3,17) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein eine deutlich höhere Anzahl von Ouabainbindungsstellen, als mit $(1,1 \pm 0,3) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein in der Rinde der gestauten Nieren von nicht behandelten Tieren. Die Anzahl der Ouabainbindungsstellen in der Rinde der kontralateralen Nieren ist mit $(13,6 \pm 2,5) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein in der behandelten und $(16,8 \pm 3,0) \times 10^{10}/\text{g}$ Protein in der unbehandelten Tiergruppe fast identisch.

3.3. Enzymeigenschaften

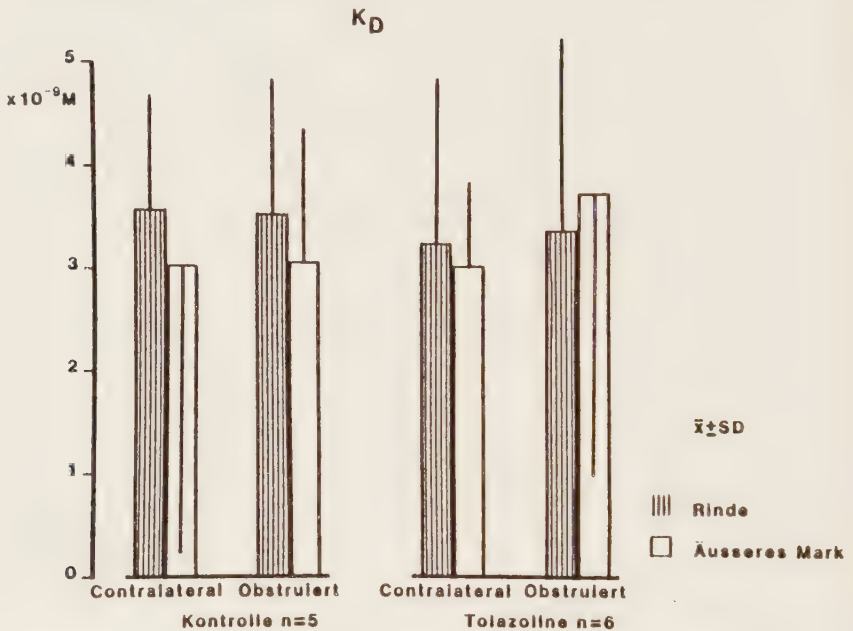


Abb. 10: Die Dissoziationskonstante K_D in den verschiedenen Ansätzen.

Die Dissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität des Enzym-Ouabain-Komplexes ist mit durchschnittlich $3,2 \times 10^{-9} M$ in allen bestimmten Ansätzen aus dem äußeren Mark und der Nierenrinde weitgehend konstant (Abb.: 10).

Die Wechselzahl der einzelnen funktionellen Einheit, d.h. die ATP-Umsatzrate eines Na-K-ATPase-Moleküls liegt im äußeren Mark der kontralateralen Nieren bei 5000 ± 1300 pro Minute in der behandelten und bei 4300 ± 800 pro Minute in der nicht behandelten Tiergruppe. In den gestauten Nieren kommt es zu einem deutlichen Anstieg auf 13600 ± 10600 pro Minute im äußeren Mark der behandelten und auf 14200 ± 10800 pro Minute im äußeren Mark der nicht behandelten Tiere. In der Nierenrinde finden sich ähnliche Resultate.

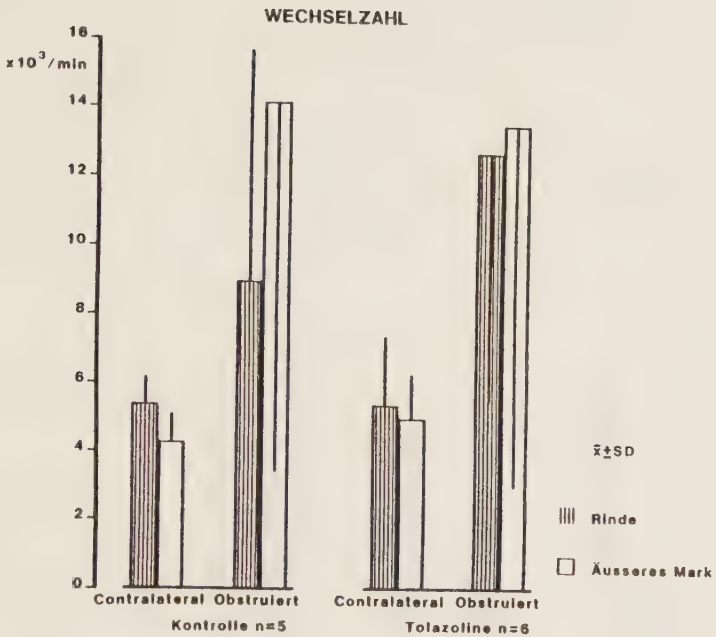


Abb. 11: Die Wechselzahl des Na-K-ATPase-Moleküls in den verschiedenen Ansätzen.

Bei den behandelten Tieren beträgt die Wechselzahl der Na-K-ATPase 5400 ± 2000 pro Minute für die kontralaterale und 12800 ± 7300 pro Minute für die gestaute Niere. Bei den nicht behandelten Tieren ergeben sich 5400 ± 800 pro Minute für die kontralaterale und 9000 ± 6700 pro Minute für die gestaute Niere (Abb. 11).

3.4. Ausscheidungsfunktion

3.4.1. Kaliumausscheidung

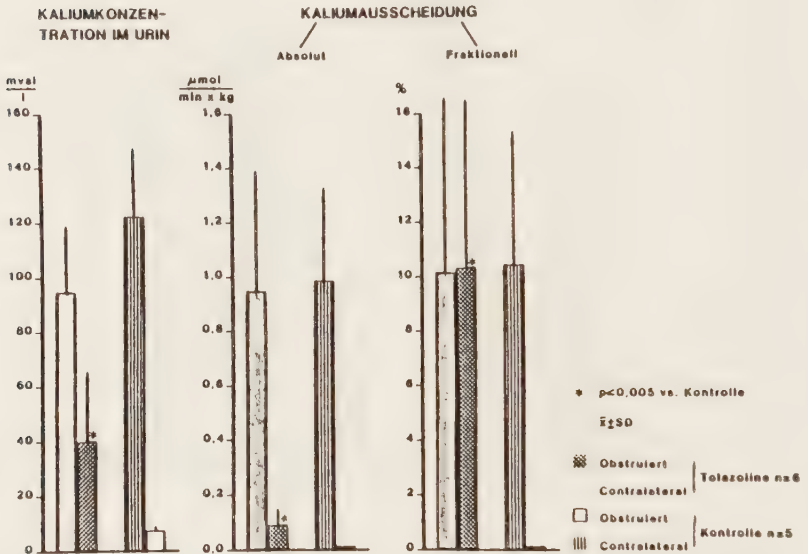


Abb. 12: Kaliumkonzentration im Urin, sowie absolute und fraktionelle Kaliumausscheidung.

Die Kaliumkonzentration im Urin einer vier Wochen obstruierten Niere entspricht weitgehend dem Serumkaliumspiegel ($7,3 \pm 1,6$ mmol/l). Nach Therapie mit Tolazoline steigt der Kaliumgehalt im Urin signifikant ($p < 0,005$) auf durchschnittliche Werte um 40 mmol/l an ($40,3 \pm 25,8$ mmol/l). Im Urin der kontralateralen Nieren finden sich $94,7 \pm 24,4$ mmol/l Kalium bei der behandelten und $122,4 \pm 25,4$ mmol/l Kalium bei der unbehandelten Tiergruppe. Zieht man gleichzeitig die geringe Urinproduktion in Betracht ($0,012 \pm 0,006$ ml/min/kg KG; Abb. 14), so ist die absolute Kaliumausscheidung über die gestaute und nicht behandelte Niere

praktisch gleich Null. Bei mit Tolazoline behandelten Tieren ist die absolute Kaliumausscheidung über die gestaute Niere ($0,09 \pm 0,06 \text{ umol/min/kg KG}$) signifikant höher ($p < 0,005$ vs. Kontrolle) und entspricht ca. 10% der über die kontralaterale Niere ausgeschiedenen Kaliummenge ($0,952 \pm 0,442 \text{ umol/min/kg KG}$). Auffallend ist, daß die Kaliumausscheidungsfraktion mit $10,3 \pm 6,2\%$ des filtrierte Kaliumloads für behandelte obstruierte Nieren praktisch identisch ist mit der der kontralateralen Nieren ($10,2 \pm 6,4\%$; Abb. 12).

3.4.2. Natriumausscheidung

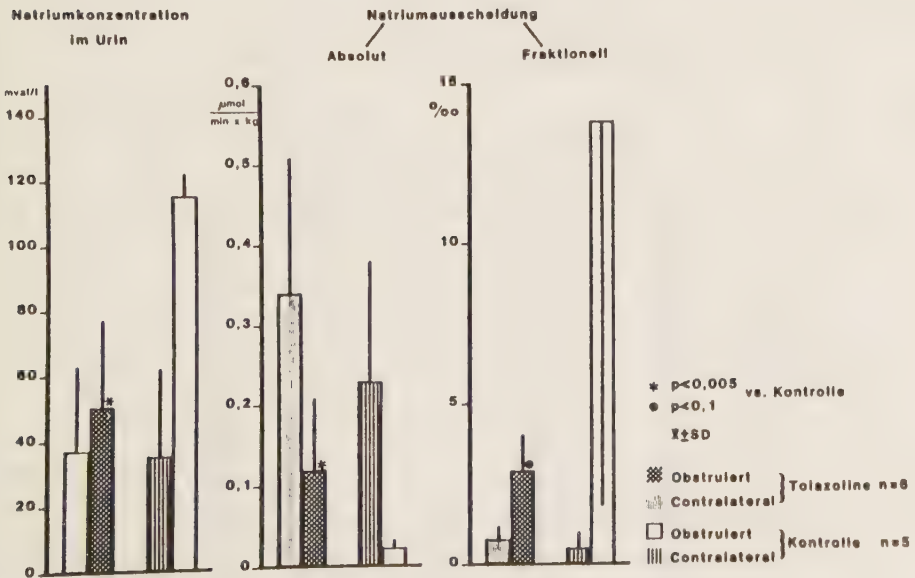


Abb. 13: Natriumkonzentration im Urin, sowie absolute und fraktionelle Natriumausscheidung.

Die vier Wochen gestaute Niere verliert mit $1,38 \pm 1,3\%$ einen hohen Anteil des filtrierte Natriumloads, wie man an der hohen Natriumkonzentration im Urin gestauter, nicht behandelter Nieren sehen kann ($111,5 \pm 6,9 \text{ mmol/l}$; Abb. 13). Auf die Elektrolytbilanz dieser Tiere hat dies nur deswegen keine schwerwiegenden Auswirkungen, da zugleich auch die Diurese dieser Nieren fast vollständig darniederliegt (3.4.3.). Die Verabreichung von Tolazoline führt zu einer deutlichen Zunahme der über die obstruierte Niere ausgeschiedenen Urinmengen (Abb. 14). Das Natriumload der gestauten Nieren ist in der behandelten Tiergruppe mit $36,6 \pm 14,6 \text{ mmol/min/kg KG}$ zwanzig-, bis fünfundzwanzigfach höher, als in der nicht therapierten mit $1,46 \pm 0,92 \text{ mmol/min/kg KG}$ (Abb. 16,17). Die Natriumausscheidung über die gestaute Niere hat jedoch nur ungefähr um den Faktor

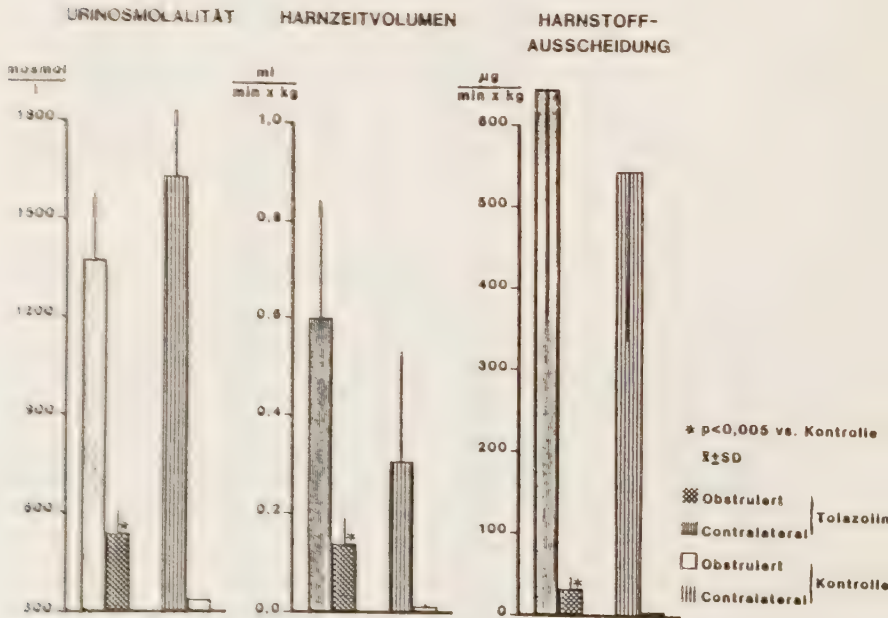


Abb. 14: Urinosmolalität, Harnzeitvolumen und Harnstoffausscheidung der verschiedenen Nieren

fünf zugenommen von $1,12 \pm 0,07$ nmol/min/kg KG auf $1,32 \pm 0,09$ nmol/min/kg KG. Dies beruht auf einer verstärkten Natriumrückresorption im Proximalabszahn zurückzuführen und zeigt sich in einer signifikanten ($p < 0,001$) Zunahme sowohl der Natriumkonzentration im Urin von $101,8 \pm 6,8$ mmol/l auf $50,5 \pm 27,7$ mmol/l, als auch der durch die konstruierten Nieren der mit Tolazoline behandelten Tiere ausgeschiedenen Fraktion des filtrierten Natriums von $1,16 \pm 1,20\%$ auf $0,28 \pm 0,11\%$ (Abb. 13).

Bei den kontralateralen Nieren der behandelten und der nicht behandelten Tiergruppen sind das Natrium von $392,4 \pm 97,4$ mmol/min/kg KG bzw. $428,1 \pm 88,6$ mmol/min/kg KG, die Natriumkonzentration im Urin mit $17,4 \pm 23,9$ mmol/l bzw. $35,4 \pm 27,3$ mmol/l, die absolute Natriumausscheidung mit $0,34 \pm 0,17$ nmol/min/kg KG bzw. $0,29 \pm 0,18$ nmol/min/kg KG und die fraktionelle Natriumausscheidung mit $1,16 \pm 0,04\%$ bzw. $0,06 \pm 0,03\%$ weitgehend miteinander identisch.

3.4.3. Harnzeitvolumen

Die Verabreichung von Tolazoline nach Zerstörung einer vierwöchigen Harnstauung führt zu einer signifikanten ($p < 0,005$ vs. Kontrolle) Zunahme der über die kontralaterale Niere ausgeschiedenen Urinmenge von $0,012 \pm 0,004$ ml/min/kg KG auf $0,139 \pm 0,032$ ml/min/kg KG (Abb. 14). Die Urinausscheidung über die kontralateralen Nieren der nicht behandelten Tiergruppe beträgt $0,007 \pm 0,007$ ml/min/kg KG, über die der behandelten Tiergruppe $0,000 \pm 0,009$ ml/min/kg KG (Abb. 14).

3.4.4. Urinosmolalität

Nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten Harnabstruktion kann die jeweilige Niere nur noch plasmatische Urin produzieren (338 ± 24 mosmol/l). Die Gabe von Tolazoline führt zu einer signifikanten ($p < 0,005$ vs. Kontrolle) Restitution der Urinkonzentrierungsfähigkeit auf Werte bis zu 600 mosmol/l (537 ± 77 mosmol/l; Abb. 14). Die kontralateralen Nieren der behandelten Tiergruppe konzen-

tieren den Urin auf Werte von 1374 ± 213 mosmol/l, die der nicht behandelten Tiergruppe auf Werte um 1635 ± 199 mosmol/l (Abb. 14).

3.4.5. Harnstoffausscheidung

Die Fähigkeit, Harnstoff auszuschcheiden ist ein weiterer wichtiger Parameter für die Funktionsfähigkeit einer Niere. Auch die Harnstoffexkretion über die gestaute Niere steigt nach Verabreichung von Tolazoline signifikant ($p < 0,005$) gegenüber der Kontrollgruppe von $0,27 \pm 0,21$ ug/min/kg KG auf $32,73 \pm 15,37$ ug/min/kg KG an (Abb. 14). Die Harnstoffausscheidung über die kontralateralen Nieren der behandelten Tiergruppe ($644,18 \pm 277,11$ ug/min/kg KG) ist mit der der nicht behandelten Tiergruppe ($545,56 \pm 207,65$ ug/min/kg KG) fast identisch (Abb. 14).

3.4.6. Gewebeosmolalität

	mit Tolazoline	ohne Tolazoline
R _{kN}	$497,4 \pm 96,9$	$427,5 \pm 67,9$
AM _{kN}	$678,1 \pm 166,4$	$732,4 \pm 44,8$
IM _{kN}	$1510,9 \pm 355,5$	$1518,2 \pm 313,0$
R _{ob}	$455,8 \pm 50,8^{1)}$	$354,3 \pm 6,8$
AM _{ob}	$489,1 \pm 61,8^{1)}$	$390,7 \pm 49,4$
IM _{ob}	$633,1 \pm 206,5^{2)}$	$300,9 \pm 66,3$

Tab. 1: Gewebeosmolalität

R = Rinde, AM = äußeres Mark, IM = inneres Mark
 kN = kontralaterale Niere, ob = obstruierte Niere
 1) $p < 0,05$ vs. ohne Tolazoline
 2) $p < 0,005$ vs. ohne Tolazoline

Eine nach vierwöchiger Harnstauung entlastete Niere hat den osmotischen Gradienten, der bei gesunden Nieren von der Rinde zum inneren Mark hin besteht, verloren und kann ihn auch nicht wiederherstellen. Nach Verabreichung von Tolazoline kommt es zu einer signifikanten ($p < 0.005$) Erholung dieses für die Harnkonzentrierung wichtigen osmotischen Gradienten (Tab. 1).

3.4.7. Regressionsgeraden

3.4.7.1. Inulin-clearance - Ouabainbindungsstellen

Die Inulin-clearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate korreliert gut ($R = 0,95$) mit der Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Mark (Abb. 15)

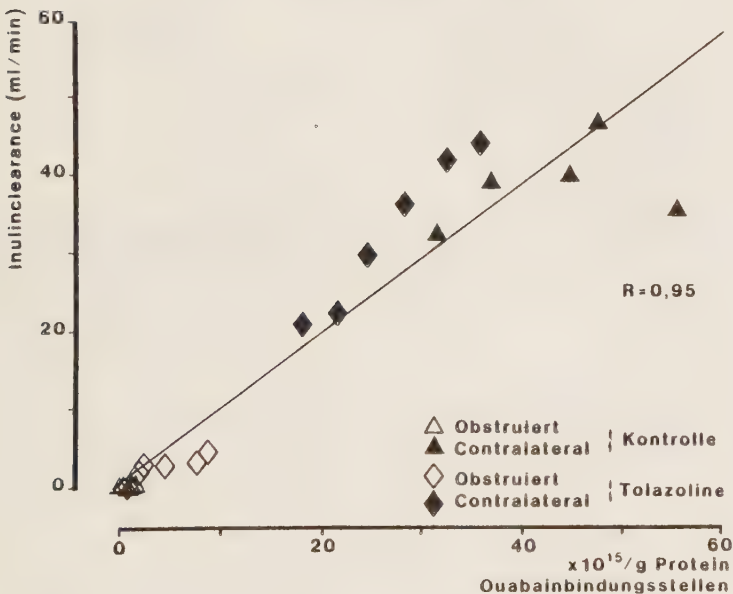


Abb. 15: Korrelation zwischen der Inulin-clearance und den Ouabainbindungsstellen

3.4.7.2. Natriumload (Kaliumload) - Ouabainbindungsstellen

Auch das Natrium- bzw. Kaliumload korrelieren eng ($R = 0,91$ bzw. $R = 0,95$) mit der Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Mark (Abb. 16, 17).

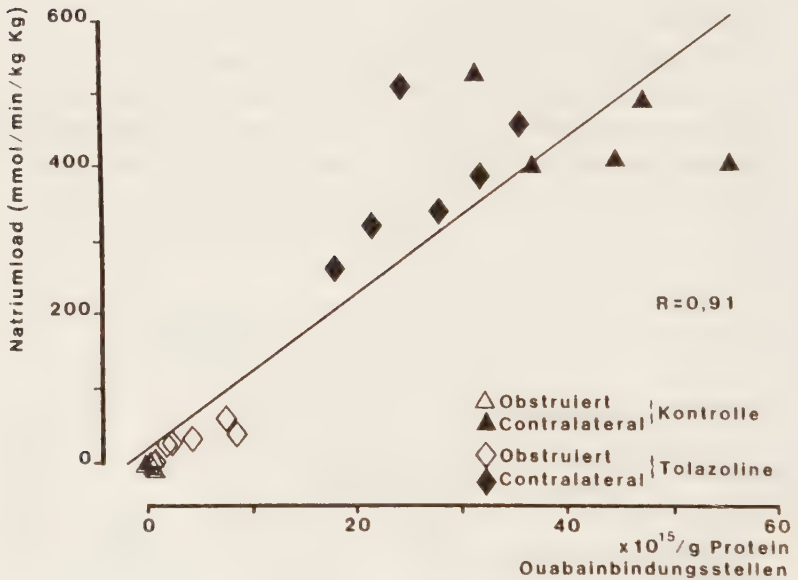


Abb. 16: Korrelation zwischen dem Natriumload und den Ouabainbindungsstellen

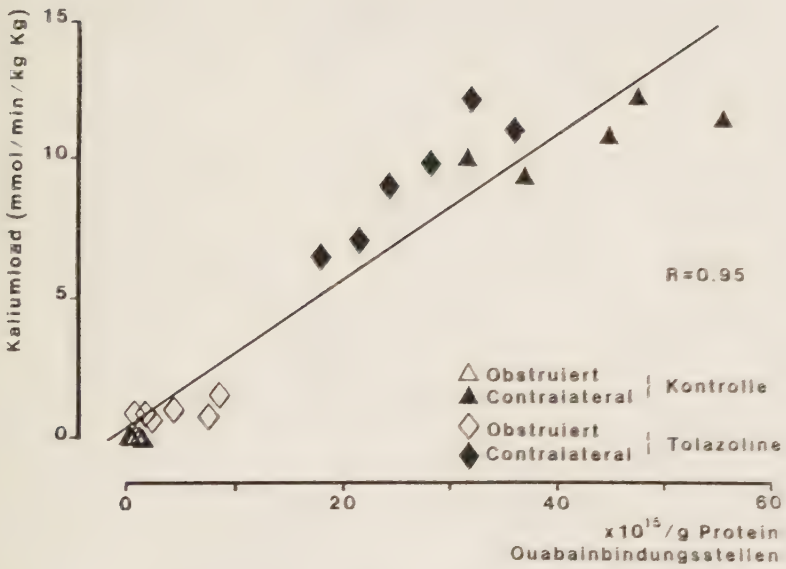


Abb. 17: Korrelation zwischen dem Kaliumload und den Ouabainbindungsstellen

3.4.7.3. Urinosmolalität - Ouabainbindungsstellen (Enzymaktivität)

Die Urinosmolalität geht streng parallel, sowohl mit der Anzahl der Ouabainbindungsstellen, als auch mit der Höhe der Aktivität der Na-K-ATPase im äußeren Mark ($R = 0,96$; Abb. 18, 19).

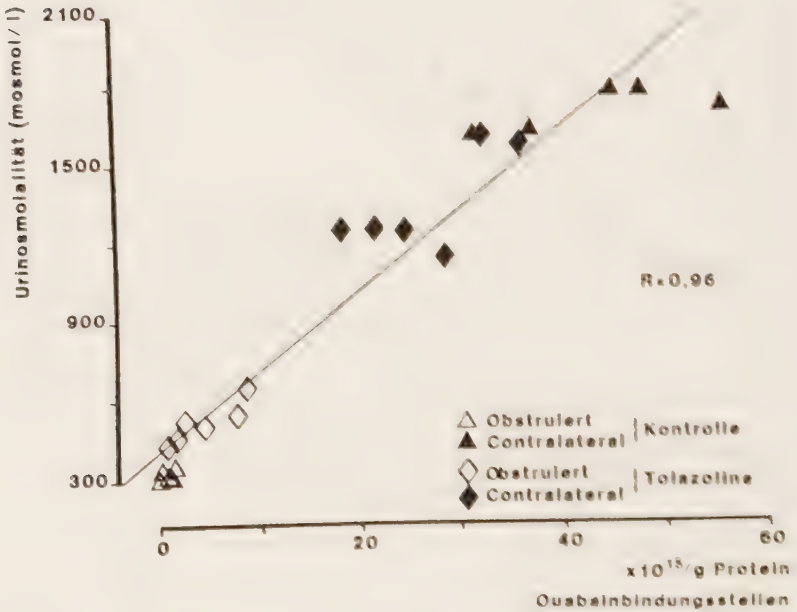


Abb. 18: Korrelation zwischen der Urinosmolalität und den Ouabainbindungsstellen

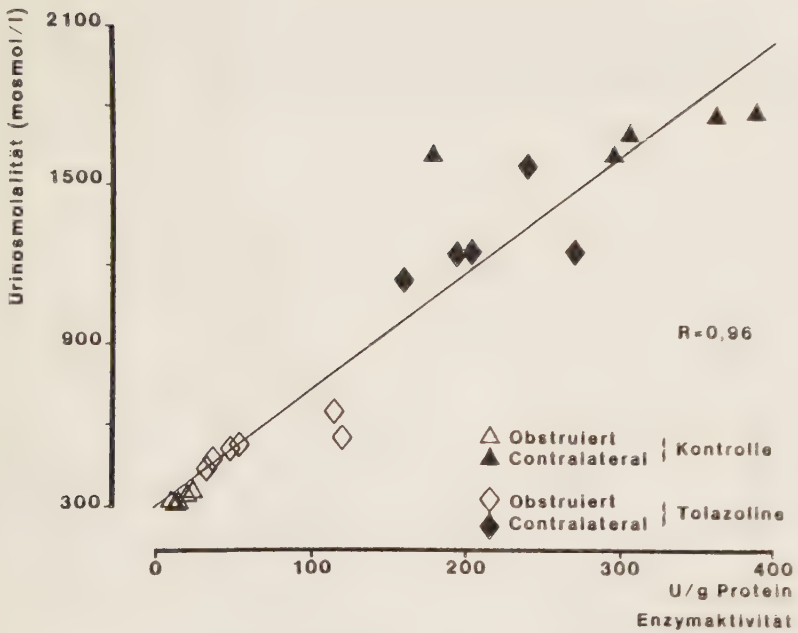


Abb. 19: Korrelation zwischen der Urinosmolalität und der Enzymaktivität

3.4.7.4. Urinosmolalität - Gewebeosmolalität

Man erkennt deutlich, daß die Fähigkeit, Urin zu konzentrieren, abhängig ist vom Aufbau eines hohen osmotischen Gradienten im inneren Mark ($R = 0,91$; Abb. 20).

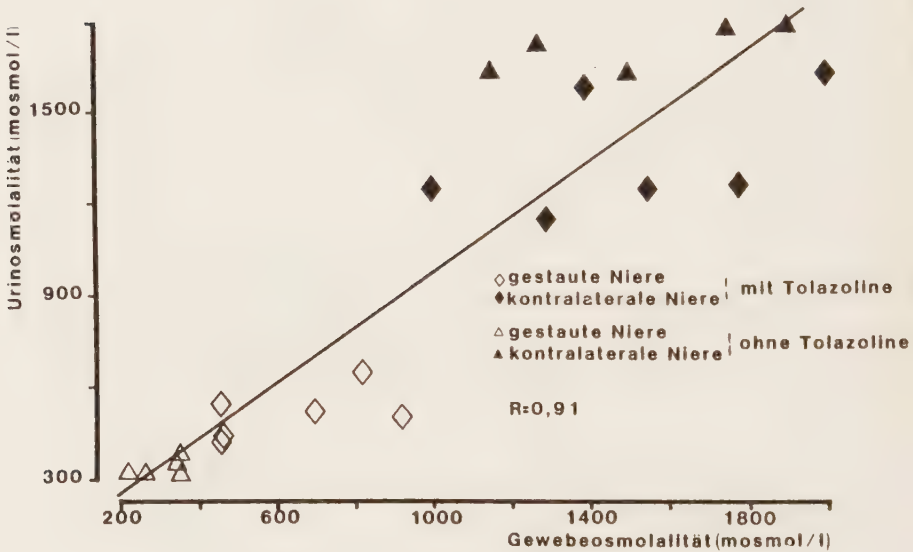


Abb. 20: Korrelation zwischen der Urin- und Gewebeosmolalität

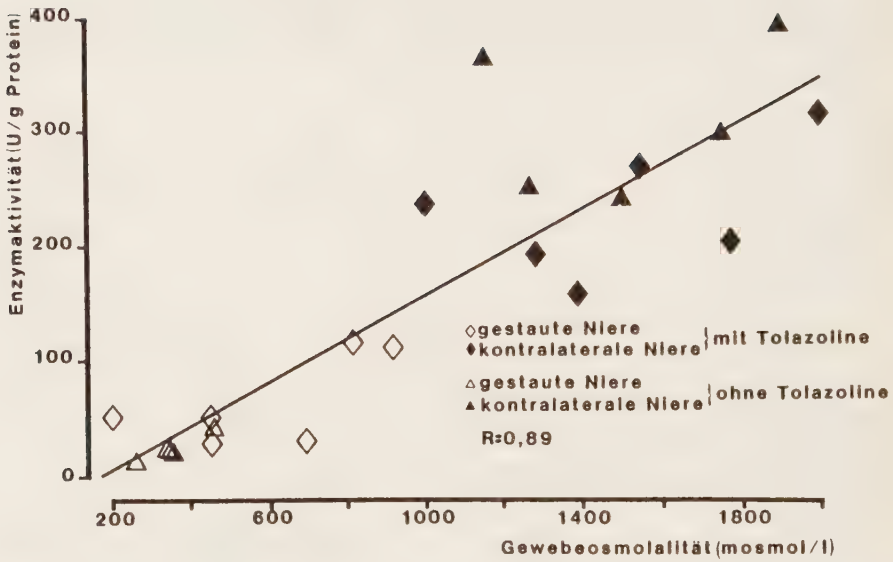


Abb. 22: Korrelation zwischen Enzymaktivität und Gewebeosmolalität

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse

4.1.1. Na-K-ATPase

Unter Therapie mit Tolazoline (5 mg/kg KG) unmittelbar nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten unilateralen Harnstauung kommt es zu einer signifikanten ($p < 0,005$ versus Kontrolle) Erholung, sowohl der Enzymaktivität von $16,1 \pm 5,6$ U/g Protein auf $64,4 \pm 36,2$ U/g Protein (Abb. 8), als auch der Anzahl der Enzym- (Na-K-ATPase-) moleküle von $(0,8 \pm 0,4) \times 10^{18}$ /g Protein auf $(4,26 \pm 3,23) \times 10^{18}$ /g Protein (Abb. 9).

Die Dissoziationskonstante K_D (Abb. 10) ist mit durchschnittlich $3,2 \times 10^{-9}$ M in allen bestimmten Ansätzen, d.h. in Proben von Rinde und äußerem Mark von gestauten und kontralateralen Nieren von mit Tolazoline behandelten und Kontrolltieren weitgehend konstant. Es ist somit davon auszugehen, daß weder durch die Harnstauung, noch durch die Verabreichung von Tolazoline die Dissoziationskonstante K_D meßbar beeinflusst wird. Büttner (1986) fand eine nicht signifikante Zunahme der K_D in der Rinde und im äußeren Mark der kontralateralen Nieren nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten unilateralen Harnstauung.

Bei der Wechselzahl (Abb. 11), d.h. der maximalen ATP-Umsatzrate pro Enzymmolekül findet sich vor allem im äußeren Mark von gestauten Nieren aus der Kontrollgruppe ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg. Dies läßt sich interpretieren als eine erhöhte ATP-Umsatzrate pro verbliebenem Enzymmolekül bei insgesamt deutlich reduzierter Anzahl derselben (Ouabainbindungsstellen) und ebenso reduzierter Gesamtenzymaktivität pro Gramm Protein. Aufgrund der starken Streuung der Ergebnisse, die am ehesten durch Schwierigkeiten bei der Probengewinnung - nach vierwöchiger Harnstauung finden sich zahlreiche narbige Veränderungen, die eine sichere Differenzierung in inneres,

äußeres Mark und Rinde nicht immer zulassen - zu erklären ist, sind die Unterschiede nicht signifikant.

4.1.2. Harnzeitvolumen

Die Behandlung mit Tolazoline nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten unilateralen Ureterobstruktion führt über eine Steigerung der glomerulären Perfusion (Huland 1983) zu einer Zunahme der glomerulären Filtrationsrate (Sturm 1986), was in einem verbesserten Harnzeitvolumen resultiert (Abb. 14).

4.1.3. Urinosmolalität

Wieland und Büttner (1986) zeigten, daß nach Entlastung unterschiedlich langer kompletter unilateraler Ureterobstruktion (1 - 4 Wochen) abhängig von der Dauer der Harnstauung eine Einschränkung des Urinkonzentrierungsvermögens auftritt. Nach einer einwöchigen Obstruktionsperiode ist eine Restitutio ad integrum die Regel. Bei weiterem Anhalten der Harnstauung kommt es zur Bildung eines immer schwächer konzentrierten Urins trotz Versuchsdurchführung nach zwanzigstündiger Wasserkarenz. Nach Aufhebung einer vierwöchigen Harnstauung wird nur noch plasmaisotoner Urin (300 mosmol/l) ausgeschieden. Im Vergleich hierzu können mit Tolazoline behandelte Tiere über die obstruierte Niere signifikant ($p < 0,005$ versus Kontrolle) höher konzentrierten Urin (537 ± 77 mosmol/l) ausscheiden (Abb. 14).

4.1.4. Elektrolyt- und Harnstoffausscheidung

Die Kaliumausscheidung - ein wichtiger Parameter bei der Stellung der Indikation zur Hämodialyse - ist nach vierwöchiger Harnstauung praktisch gleich Null. Durch Verabreichung von Tolazoline unmittelbar postobstruktiv kommt es zu einer signifikanten ($p < 0,005$ versus Kontrolle) Erholung der absoluten Kaliumexkretion auf $0,09 \pm 0,06$ umol/min/kg KG. Es fällt auf, daß die fraktionelle Kaliumausscheidung der gestauten und behandelten Nieren mit $10,3 \pm 6,2\%$ des filtrierte Kaliumloads identisch ist mit der

der kontralateralen Nieren ($10,2 \pm 6,4\%$; Abb. 12). Möglicherweise ist die Zunahme der Kaliumausscheidung auf die Erholung der Na-K-ATPase zurückzuführen. Nach Untersuchungen von Thirakomen (1976) ist eine Regeneration des distalen K^+ -H⁺-Gegentransportes nicht zu erwarten.

Als Zeichen für die erhöhte Konzentrationsfähigkeit der Niere nach Therapie mit Tolazoline gehen die Natriumkonzentration im Urin und die fraktionelle Ausscheidung des filtrierten Natriumloads zurück (Abb. 13). Aufgrund des deutlich gesteigerten Harnzeitvolumens kommt es dennoch zu einer Zunahme der absoluten Natriumexkretion.

Im Rahmen der Höherkonzentrierung des Urins findet man auch einen Wiederanstieg der Harnstoffausscheidung nach Tolazolinegabe.

4.2. Diskussion der gefundenen Ergebnisse unter Berücksichtigung pathophysiologischer Aspekte

Die Fähigkeiten der Niere, bestimmte Stoffe zu eliminieren (z.B. Kalium, Harnstoff), bzw. bei reduzierter Flüssigkeitsaufnahme den Urin zu konzentrieren sind elementare Voraussetzungen für die Homöostase. Zentrales Element der Urinkonzentrierung ist der Gegenstrommechanismus der Nieren. Stephenson (1972) und Kokko und Rector (1972) beschreiben ein Modell für die Harnkonzentrierung, bei dem es durch Wasserdiffusion aus den Sammelrohren in ein Zentralkompartiment (bestehend aus den Vasae rectae und dem Interstitium), innerhalb welchem die freie Diffusion von Wasser, Elektrolyten und Harnstoff gewährleistet ist, zur Herstellung eines konzentrierten Endharns kommt. Je nach dem Hydratierungszustand des Organismus wird durch das antidiuretische Hormon (ADH) die Wasserpermeabilität der Sammelrohre und damit die Wasserrückresorption moduliert. Die aktive Rückresorption von Natrium im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife durch die Na-K-ATPase spielt eine wichtige Rolle im Urinkonzentrationsmechanismus. Wilson (1978) konnte zeigen, daß bei beidseitiger Hydronephrose eine enge

Korrelation besteht zwischen der Na-K-ATPase-Aktivität im äußeren Mark und der Fähigkeit, Urin konzentrieren zu können. Entsprechende Resultate fand Büttner (1986) bei einseitiger Harnstauung. Auch die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß proportionale Veränderungen zwischen der Urinosmolalität und der Aktivität der Na-K-ATPase, bzw. der Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Mark bestehen (siehe Abb. 18, 19). Ebenso eng korrelieren miteinander die Aktivität der Na-K-ATPase, bzw. die Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Mark und die Gewebeosmolalität (siehe Abb. 21, 22). Die Urinosmolalität und die Gewebeosmolalität gehen ebenfalls miteinander parallel (siehe Abb. 20).

Hendler (1971) fand, daß sich die höchste Aktivität der Na-K-ATPase in Hunde- bzw. Rattennieren in deren äußerem Mark messen läßt (Abb. 23). Auch wir haben in allen bestimmten Ansätzen die höchste Enzymaktivität, bzw. Anzahl von Ouabainbindungsstellen jeweils im äußeren Mark gemessen (Abb. 8, 9). Katz (1982) konnte zeigen, daß sich im Nieren

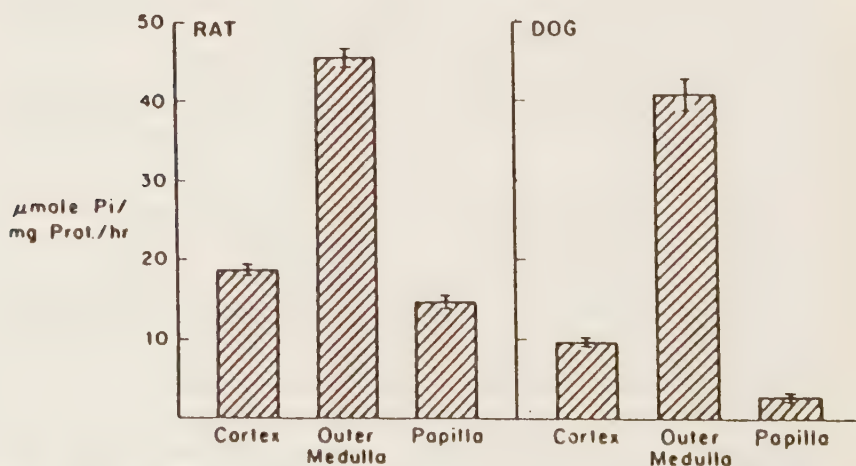


Abb. 23: Verteilung der Na-K-ATPase-Aktivität im Gewebe von Ratten- und Hundenieren (Hendler 1971).

gewebe die höchste Na-K-ATPase-Aktivität im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife und im distalen Konvolut nachweisen läßt (Abb. 24). Diese beiden Nephronabschnitte haben den größten Anteil an der Gewebemasse des äußeren Marks. Aktive Transportmechanismen im Gegenstrommechanismus finden sich fast ausschließlich in diesen beiden Nephronsegmenten. Die aktive Natriumrückresorption im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife stellt die Energie für die Feinregulation der Wasserausscheidung in den nachfolgenden Nephronabschnitten durch den Gegenstrommechanismus zur Verfügung. Sämtliche der folgenden Austauschvorgänge sind durch Unterschiede in den Membranpermeabilitäten der verschiedenen Nephronsegmente gesteuert, wobei der im äußeren Mark vom Kochsalz getragene osmotische Gradient in einen im Zentralkompartiment des inneren Marks vom Harnstoff getragenen osmotischen Gradienten umgewandelt wird

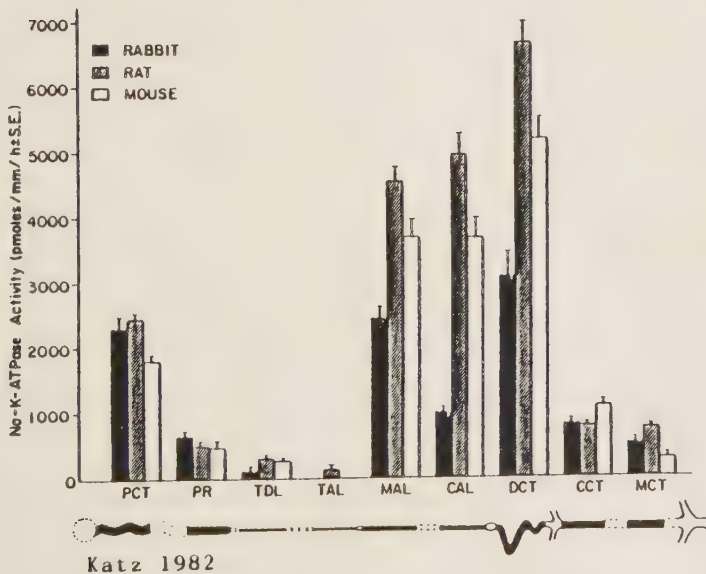


Abb. 24: Verteilung der Na-K-ATPase-Aktivität entlang eines Nephrons beim Kaninchen, der Ratte und der Maus (Katz 1982)

(Kokko 1974). Der aktive Transport von Natriumchlorid im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife besteht aus einem primär aktiven Natriumtransport durch die ouabainhemmbare Na-K-ATPase und einem sekundär aktiven Chloridtransport (Jørgensen 1980), welcher durch Furosemid hemmbar ist (Proverbio 1986).

Die Aktivität der Na-K-ATPase ist abhängig vom Natriumangebot. So zeigte Snarski (1985), daß ein gesteigertes tubuläres Natriumload bei kochsalzbelasteten Ratten zu einer Erhöhung der Na-K-ATPase-Aktivität vor allem im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife führt. Umgekehrt hielt Katz (1982) ein vermindertes intratubuläres Natriumangebot für eine mögliche Ursache der reduzierten Na-K-ATPase-Aktivität bei der einseitigen Hydronephrose.

Bei der unilateralen Hydronephrose kommt es zu einer deutlichen präglomerulären Vasokonstriktion (Moody 1975), die vor allem Thromboxan-A₂ vermittelt ist (Morrison et al. 1977), und damit auch zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, was sich in einem verminderten tubulären Natriumload (siehe Abb. 16) auswirkt. Die Folge ist ein Rückgang der Na-K-ATPase-Aktivität vor allem im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife, wohl aufgrund eines verminderten Natriumangebots.

Die Verabreichung von Tolazoline, einem Thromboxan-synthetase-Hemmer, nach Entlastung einer vierwöchigen Harnstauung führt zu einer Aufhebung des präglomerulären Vaso-spasmus und einer annähernden Wiederherstellung der physiologischen Durchblutungsverhältnisse (Huland 1983). Man beobachtet eine deutliche Verbesserung der postobstruktiven Nierenfunktion (Sturm 1986). Hierbei kommt es auch zu einem erheblichen Wiederanstieg des tubulären Natriumloads (siehe Abb. 16), was über eine Verbesserung des Substratangebots an die Na-K-ATPase im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife zu deren Aktivitätssteigerung führt. Welche Rolle das durch die verbesserte Durchblutung der Glomerula und auch des Markraums sicherlich erhöhte Sauerstoffangebot bei der Steigerung der Enzymaktivität und der Anzahl der

Ouabainbindungsstellen spielt, ist bisher noch nicht untersucht.

Die Reaktivierung der Na-K-ATPase im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife führt über eine vermehrte Natriumrückresorption zu einer Zunahme der osmotisch wirksamen Teilchen im äußeren Mark. Ebenso nimmt der tubuläre Flow durch die Verbesserung der glomerulären Filtrationsrate nach Tolazolineverabreichung zu (Sturm 1986). Diese beiden Mechanismen sind die Energielieferanten, die zu einer Reaktivierung des Gegenstrommechanismus führen. Die für Wasser impermeable Membran des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife hat zur Folge, daß der Urin im distalen Konvolut durch die im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife stattgehabte Natriumrückresorption hypoton ist und der Harnstoff die hauptsächlich gelöste Substanz darstellt. Die kortikalen Sammelrohre sind wasserdurchlässig, aber harnstoffimpermeabel. Der durch die Kochsalzrückresorption erhöhte interstitielle osmotische Gradient im äußeren Mark führt dort zu einer Wasserdiffusion aus dem wasserdurchlässigen absteigenden Ast der Henleschen Schleife, wie auch aus den Sammelrohren. Der durch die passive Wasserrückresorption im kortikalen und äußeren medullären Sammelrohr stark konzentrierte Harnstoff kann erst im inneren medullären Anteil des Sammelrohres ins Interstitium zurückdiffundieren und dort den bereits bestehenden, durch Kochsalz hervorgerufenen osmotischen Gradienten erhöhen. Dieser Gradient führt zu einem Entzug von Wasser aus dem absteigenden Ast der Henleschen Schleife. Durch den hohen Harnstoffgradienten und den Abtransport von Natrium aus dem äußeren Mark mit dem Blutstrom ist das Natrium im inneren Mark relativ verdünnt, so daß Natrium passiv aus dem dünnen aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife rückresorbiert werden kann. Gleichzeitig strömt aber auch Harnstoff in den dünnen aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife ein. So wird der durch aktiven Natriumtransport mittels der Na-K-ATPase im äußeren Mark geschaffene und von Kochsalz getragene osmotische Gradient in

einen vom Harnstoff und Kochsalz gemeinsam getragenen osmotischen Gradienten im inneren Mark umgewandelt (Kokko 1974). Die Na-K-ATPase ist der Motor für diesen Mechanismus, ist dabei aber von der Substratzufuhr durch eine adäquate Filtration abhängig. Der Wiederaufbau des osmotischen Gradienten von der Rinde zum inneren Mark hin ist in den vorliegenden Untersuchungen durch die Bestimmung der Urin- und Gewebeosmolalität dokumentiert (Abb. 14; Tab. 1).

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Universität München (Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Brendel) durchgeführt.

Die Enzymanalysen habe ich im Forschungslabor der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern der Universität München (Vorstand: Professor Dr. G. Riecker) durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Die Gabe von Tolazoline (5 mg/kg KG) unmittelbar nach Entlastung einer vierwöchigen kompletten unilateralen Harnstauung führt zu einer deutlich verbesserten Durchblutung der postobstruktiven Niere im Vergleich zu Kontrolluntersuchungen (Huland 1983), was mit einer signifikanten Erholung der Ausscheidungsfunktion einhergeht (Sturm 1986).

Der gesteigerte renale Blutfluß bewirkt eine Zunahme der glomerulären Filtrationsrate, infolge derer auch das tubuläre Natriumload erhöht ist. Ein hohes Natriumangebot führt über eine Reaktivierung der Na-K-ATPase (Katz 1982, Snarski 1985), besonders im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife, zu einem Wiederanstoßen des Gegenstrommechanismus. Damit kommt es zumindest zu einer partiellen Restitution der Fähigkeit, Urin konzentrieren zu können. Eine vollständige Wiederherstellung der präobstruktiven Nierenfunktion ist nicht zu erwarten, da nach einer vierwöchigen kompletten Harnstauung bereits histologisch nachweisbare, irreversible morphologische Veränderungen eingetreten sind, die eine Restitutio ad integrum als ausgeschlossen erscheinen lassen (Sturm 1986).

Die Erholung der Na-K-ATPase zeigt sich in einer signifikant höheren Enzymaktivität und Anzahl der Ouabainbindungsstellen im äußeren Mark der gestauten Nieren der mit Tolazoline behandelten Tiere im Vergleich zu Kontrollversuchen. Welche Rolle das verbesserte Sauerstoffangebot durch den wohl auch im äußeren Mark gesteigerten Blutfluß bei der Erholung der Na-K-ATPase-Aktivität und damit der Nierenfunktion spielt, ist noch nicht geklärt.

Die Na-K-ATPase ist ein zentrales Glied im Mechanismus der Harnkonzentrierung. Sie ist als Energielieferant für den Gegenstrommechanismus aber vom Substratangebot durch eine adäquate Filtration abhängig.

6. Literaturverzeichnis

- Alexander, J.C., and Lee, J.B.:
Effect of osmolality on Na-K-ATPase in outer renal medulla.
Am.J.Physiol. 219: 1742 - 1745, 1970
- Alken, C.E. und J., Sökeland:
Zur Terminologie der Harnstauungsniere.
Der Urologe 5 (3): 97 - 100, 1966
- Allen, J.C., Martinez-Maldonado, M., Eknayan, G., Suki, W.
N., and Schwartz, A.:
Relation between Digitalis binding in vivo and inhibition
of Sodium. Potassium-Adenosine Triphosphatase in Canine
kidney.
Biochem.Pharmacol. 20: 73 - 80, 1971
- Aperia, A., Merin, F., Josephson, S. and Lämmergren, K.:
Renal function in dogs with chronic moderate unilateral ob-
struction.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 42: 1 - 8, 1982
- Bercovitch, D.D., L. Kasen, L. Blann, and M.F. Levitt:
The postobstructive kidney.
Observations on Nephron Function after the Relief of 24hr
of Ureteral Ligation in the Dog.
J.clin.Invest. 50: 1154 - 1165, 1971
- Berliner, R.W., and Bennett, C.M.:
Concentration of Urine in the Mammalian Kidney.
Am.J.Med. 42: 777 - 789, 1967
- Berlyne, R.W., and Macken, A.:
On the mechanism of renal inability to produce a
concentrated urine in chronic hydronephrosis.
Clin.Sci. 22: 315, 1962
- Besarab, A., Silva, P., and Epstein, F.H.:
Multiple pumps for sodium reabsorption by the perfused
kidney.
Kidney Int. 10: 147 - 153, 1976

Büttner, M.:

Pathophysiologie und Regenerationsfähigkeit der chronischen Harnstauungsniere unter besonderer Berücksichtigung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

Dissertationsschrift LMU, München 1986

Büttner, M., Brown, L., Wieland, W.F. and Erdmann, E.:

Renal Function and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in chronic uniolateral Hydronephrosis in Dogs.

J.Urol. 135: 185 - 190, 1986

Burg, M.B.:

Renal Handling of Sodium, Chloride, Water, Amino Acids, and Glucose.

The Kidney, 145 - 175, 3rd Edition 1986, Brenner and Rector

Burg, M.B.:

Thick ascending limb of Henle's loop.

Kidney Int. 22: 454 - 464, 1982

Burg, M.B., Green, N.:

Function of the thick ascending limb of Henle's loop.

Am.J.Physiol. 224: 659 - 668, 1973

Celsi, G., Larsson, L., and Aperia, A.:

Proximal tubular reabsorption and Na-K-ATPase activity in remnant kidney of young rats.

Am.J.Physiol. 251: F588 - F593, 1986

Cruz-Soto, M., Benabe, J.E., Lopez-Novoa, J.M., and Martinez-Maldonado, M.:

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ Inhibitors and renin release: relationship to calcium.

Am.J.Physiol. 247: F650 - F655, 1984

DeWardener, H.E., MacGregor, G.H., Clarkson, E.M.,

Alaghband-Zadeh, J., Bitensky, L., and Chayen, J.:

Effect of sodium intake on ability of human plasma to inhibit renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-adenosine triphosphatase}$ in vitro.

Lancet 1: 411- 412, 1981

Doucet, A., and Barlet, C.:

Evidence for Differences in the Sensitivity to Ouabain of NaK-ATPase along the nephrons of Rabbit kidney.

J.Biol.Chem. 261(3): 993 - 995, 1986

Doucet, A., Hus-Citharel, A., and Morel, F.:
In vitro stimulation of Na-K-ATPase in rat thick ascending
limb by dexamethasone.

Am.J.Physiol. 251: F851 - F857, 1986

Doucet, A., and Katz, A.I.:

Renal potassium adaption: Na-K-ATPase activity along the
nephron after chronic potassium loading.

Am.J.Physiol. 238: F380 - F386, 1980

Doucet, A., Katz, A.I. and Morel, F.:

Determination of Na-K-ATPase activity in single segments of
the mammalian nephron.

Am.J.Physiol. 237: F105 - F113, 1979

Ebel, H., Ehrlich, J., DeSanto, N.G., Doerken, U.:

Plasma membranes of the kidney III.

Influence of diuretics on ATPase activity.

Pflügers Arch. 335: 224 - 234, 1972

Eknoyan, G., Suki, W.N., Martinez-Maldonado, M., and

Anhalt, M.A.:

Chronic hydronephrosis: observations on the mechanism of
the defect in urine concentration.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134: 634, 1970

ElMernissi, G., and A. Doucet:

Quantitation of ^3H -ouabain binding and turnover of Na-K-
ATPase along the rabbit nephron.

Am.J.Physiol. 247: F158 - F167, 1984

Epstein, F.H., Charney, A.N., Silva, P.:

Factors influencing the increase in Na-K-ATPase in
compensatory renal hypertrophy.

Yale J.Biol.Med. 51: 356 - 372, 1978

Epstein, F.H., Silva, P.:

Role of sodium, potassium-ATPase in renal function.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 242: 519 - 526, 1977

Erdmann, E., and W. Schoner:

Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase
preparations from different tissues and species.

Determination of kinetic constants and
dissociation constants.

Biochim.Biophys.Acta 307: 386 - 398, 1973

Ernst, S.A., and Schreiber, J.H.:
Ultrastructural Localization of Na⁺,K⁺-ATPase in Rat and
Rabbit Kidney Medulla.
J.Cell.Biol. 91: 803 - 813, 1981

Eveloff, J., Bayerdörffer, E., Silva, P., and Kinne, R.:
Sodium-Chloride Transport in the Thick Ascending limb of
Henle's Loop: Oxygen Consumption Studies in isolated Cells.
Pflügers Archiv 389: 263 - 270, 1981

Fanestil, D.D.:
Renal Na⁺-K⁺-ATPase relationship to total functional renal
mass.
Nature 218: 176, 1968

Finkelstein, F.O., Hayslett, J.P.:
Role of medullary Na-K-ATPase in renal potassium adaption.
Am.J.Physiol. 292: 524 - 528, 1975

Finkelstein, F.O., Hayslett, J.P.:
Role of medullary structures in the functional adaption of
renal insufficiency.
Kidney Int. 6: 419 - 425, 1974

Fisher, K., Welt, L.G., and Hayslett, J.P.:
Dissociation of Na-K-ATPase specific activity and net
reabsorption of sodium.
Am.J.Physiol. 228: 1745 - 1749, 1975

Gaudio, K.M., Stromski, M., Thubin, G., Ardito, T.,
Kashgarian, M., and Siegel, N.J.:
Postischemic hemodynamics and recovery of renal adenosine
triphosphate.
Am.J.Physiol. 251: F603 - F609, 1986

Gillenwater, J.Y., Westervelt, F.B.Jr., Vaughan, E.D.Jr.,
and Howards, S.S.:
Renal function after release of chronic unilateral
hydronephrosis in man.
Kidney Int. 7: 179 - 186, 1975

Goldin, S.M.:
Active transport of sodium and potassium ions by the sodium
and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from
renal medulla.
J.Biol.Chem. 252: 5630 - 5642, 1977

Haas, J.A., Granger, J.P., and Knox, F.G.:
Effect of renal perfusion pressure on sodium reabsorption
from proximal tubules of superficial and deep nephrons.
Am.J.Physiol. 250: F425 - F429, 1986

Hendler, E., Torreti, J., and Epstein, F.H.:
The distribution of sodium-potassium-activated adenosine
triphosphatase in medulla and cortex of the kidney.
J.clin.Invest. 50: 1329 - 1337, 1971

Hogg, R.J., and Kokko, J.P.:
Urine Concentrating and Diluting Mechanisms in Mammalian
Kidneys.
The Kidney, 251 - 279, 3rd Edition 1986, Brenner and Rector

Honda, N., Aizawa, C., Morikawa, A., and Yoshitoshi, Y.:
Effect of elevated ureteral pressure on renal medullary
osmolal concentration in hydropenic rabbits.
Am.J.Physiol. 221: 698 - 703, 1971

Jacobson, M.P., Rodriguez, H.J., Hogan, W.C., and Klahr,
S.:
Mechanism of activation of renal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the rat:
effects of reduction of renal mass.
Am.J.Physiol. 239: F281 - F288, 1980

Jaenicke, J.R.:
The renal functional defect of postobstructive nephropathy.
The effects of bilateral ureteral obstruction in the rat.
J.clin.Invest. 51: 2999 - 3006, 1972

Jaenicke, J.R., and Bray, G.A.:
Effects of acute transitory urinary obstruction in the dog.
Am.J.Physiol. 199: 1219 - 1222, 1960

Jørgensen, P.L.:
Sodium and Potassium ion pump in kidney tubules.
Physiol.Rev. 60: 864 - 917, 1980

Katz, A.I.:
Renal $\text{Na} - \text{K} - \text{ATPase}$: its role in tubular sodium and potassium
transport.
Am.J.Physiol. 242: F207 - F219, 1982

Katz, A.I., Doucet, A., and Morel, F.:
Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat, and mouse
nephron.
Am.J.Physiol. 237: F114 - F120, 1979

Katz, A.I., and Epstein, F.H.:
The Role of Sodium-Potassium-Activated Adenosine
Triphosphatase in the Reabsorption of Sodium by the Kidney.
J.clin.Invest. 52: 796 - 804, 1973

Kerr, W.S.:
Effect of complete ureteral obstruction in dogs on kidney
function.
Am.J.Physiol. 184: 521, 1956

Kiil, F., Hartmann, A., Langberg, H., Sejersted, O.M., and
Holthe, M.R.:
Renal Na,K-Adenosine Triphosphatase Transport Rate Limits
Transcellular NaCl Reabsorption in Distal Nephrons of
Volume-Expanded Dogs.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 238(1): 327 - 333, 1986

Kim, J.K., Summer, S.N., Erickson, A.E., and Schrier, R.W.:
Role of arginine vasopressin in medullary thick ascending
limb on maximal urinary concentration.
Am.J.Physiol. 251: F266 - F270, 1986

Knepper, M.A.:
Urea transport in nephron segments from medullary rays of
rabbits.
Am.J.Physiol. 244: F622, 1983

Knepper, M.A.:
Urea transport in isolated thick ascending limbs and
collecting ducts from rats.
Am.J.Physiol. 245: F634, 1983

Knox, W.H., Sax, J.A., Wilson, D.R., and Sen, A.K.:
Effect of osmolality on renal medullary Na-K-ATPase
activity in the postobstructive kidney.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 55: 1112 - 1115, 1977

Kokko, J.P., and Rector, F.C.Jr.:
Countercurrent multiplication system without active
transport in inner medulla.
Kidney Internat. 2: 214 - 223, 1972

Kramer, H.J., Baecker, A., Weiler, E., and Liddiard, C.:
Studies on Ouabain-Like Endogenous Natriuretic Factors in
Human Urine. Inhibition of Na-K-ATPase and ^3H -Ouabain
Binding.

Klin.Wochenschr. 64: 760 - 766, 1986

Levitt, D.G.:

The mechanism of the sodium pump.

Biochim.Biophys.Acta 604: 321 - 345, 1980

Lowry, O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., and Randall,
R.J.:

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J.Biol.Chem. 193: 265 - 275, 1951

Malone, D., Lubowitz, H.:

The effect of filtered Na load per nephron on renal Na-K-
ATPase activity.

Kidney Int. 6: 72A, 1974

Martinez-Maldonado, M., Allen, J.C., Eknayan, G., Suki, W.,
and Schwartz, A.:

Renal Concentrating Mechanism: Possible Role for Sodium-
Potassium Activated Adenosine Triphosphatase.

Science 165: 807 - 808, 1969

Martinez-Maldonado, M., Allen, J.C., Inagaki, C.,

Tsaparase, N., and Schwartz, A.:

Renal sodium-potassium activated adenosine triphosphatase
and sodium reabsorption.

J.clin.Invest. 51: 2544 - 2551, 1972

Martinez-Maldonado, M., Eknayan, G., Allen, J.C., Wadi, N.,
Suki, W., and Schwartz, A.:

Urine dilution and concentration after digoxin infusion
into the renal artery of dogs.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134: 855, 1970

McDougal, W.S., and Wright, F.S.:

Defect in proximal and distal sodium transport in post-
obstructive diuresis.

Kidney Int. 2: 304 - 317, 1972

Moody, T.E., Vaughan, E.D.Jr., and Gillenwater, J.Y.:
Comparison of the renal hemodynamik response to unilateral
and bilateral ureteral occlusion.
Invest.Urol. 14: 455 - 459, 1977

Morrison, A.R., Nishikawa, K., and Needleman, P.:
Thromboxane-A₂ Biosynthesis in the ureter obstructed
isolated perfused kidney of the rat.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 205: 1 - 8, 1977

Mujas, S.K., Chekal, M.A., Hayslett, J.P., and Katz, A.I.:
Regulation of renal Na⁺-K⁺-ATPase in the rat: role of
increased potassium transport.
Am.J.Physiol. 251: F199 - F207, 1986

Nagamune, H., Urayama, O., Hara, Y., and Nakao, M.:
Characterization of Ouabain-Sensitive Phosphatase Activity
in the Absence of Potassium Ion in Purified Pig Kidney
Na,K-ATPase.
J.Biochem. 99: 1613 - 1624, 1986

Nechay, B.R.:
Relationship between inhibition of renal Na,K-ATPase and
natriuresis.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 242: 501 - 518, 1974

Nechay, B.R., and Nelson, J.A.:
Renal Ouabain-Sensitive Adenosine Triphosphatase Activity
and Na⁺ Reabsorption.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 175: 717 - 726

Qvchimikov, Yu.A., Modyanov, N.N., Bronde, N.E., Petrukhin,
K.E., Grishin, A.V., Arzamazova, N.M., Aldanova, N.A.,
Monastyrskaya, G.S., and Sverdlov, E.D.:
Pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase.
Primary structure and spatial organization.
FEBS letters 201: 237 - 245, 1986

Pennell, J.P., Lacy, F.B., and Jamison, R.L.:
An in vivo study of the concentrating process in the
descending limb of Henle's loop.
Kidney Int. 5: 337, 1974

Richterich. R.:
Klinische Chemie - Theorie und Praxis.
Basel, München, Paris, London, New York, Sydney: S. Karger,
3rd Edition, 1971

Rocha, A.S., Kokko, J.P.:
Sodium chloride and water transport in the medullary thick
ascending limb of Henle.
Evidence for active chloride transport.
J.clin.Invest. 52: 612 - 623, 1973

Rodriguez, H.J., Hogan, W.C., Hellman, R.N., Klahr, S.:
Mechanism of activation of renal Na-K-ATPase in the rat:
effect of potassium loading.
Am.J.Physiol. 238: F315 - F323, 1981

Sachs, G.:
Ion pumps in the renal tubule.
Am.J.Physiol. 233: F359 - F365, 1977

Saito, H., Nishida, H., Monma, Y., and Tanabe, T.:
Intrarenal distribution and ATPase inhibiting activity of
ouabain in dogs.
Jpn.J.Pharmacol. 26: 171 - 177, 1976

Scatchard, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Bull.N.Y.Acad.Sci. 51: 660, 1949

Schmidt, U., and Dubach, U.C.:
Activity of (Na-K)-stimulated adenosine-triphosphatase in
the rat nephron.
Pflügers Arch. 306: 219 - 226, 1969

Schmidt, U., and Dubach, U.C.:
Induction of (Na-K)-ATPase in the proximal and distal
convolution of the rat nephron after uninephrectomy.
Pflügers Arch. 346: 39 - 48, 1974

Schoner, W., von Ilberg, C., Kramer, R., and Seubert, W.:
On the mechanism of Na⁺ and K⁺-stimulated hydrolysis of
adenosine triphosphatase.
1. Purification and Properties of Na⁺ and K⁺-activated
ATPase from ox brain.
Eur.J.Biochem. 1: 334, 1967

Schuurmans-Stekhoven, F., and Bonting, S.L.:
Sodium-potassium-activated adenosine-triphosphatase.
Bonting, de Pont: Membrane transport, 159 - 182, Biomedical
Press 1981, Elsevier/North-Holland

Sejersted, O.M.:

Renal Na-K-ATPase activity during saline infusion in the rabbit.

Acta Physiol.Scand. 99: 323 - 335, 1977

Sejersted, O.M., Monclair, T., Mathisen, O., Hartmann, A., and Kiil, F.:

Dependency of renal potassium excretion on Na,K-ATPase transport rate.

ActaPhysiol.Scand. 123: 9 - 19, 1984

Shaver, J.L., Stirling, C.:

Ouabain binding to renal tubules of the rabbit.

J.Cell Biol. 76: 278 - 292, 1978

Silva, P., Hayslett, J.P., and Epstein, F.H.:

The role of Na-K-activated adenosine triphosphatase in potassium adaption: stimulation of enzymatic activity by potassium loading.

J.clin.Invest. 52: 2665 - 2671, 1973

Skou, J.C.:

Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane.

Physiol.Rev. 45: 596, 1965

Snarski, J., Snarski, A., Bachalet, M., Bader, C., and Ulman, A.:

(Na-K)ATPase Activity along the Nephrons in Normal and Adrenalectomized Rats Measured by Quantitative Cytochemistry.

Cell Biochemistry and Function 3: 127 - 132, 1985

Sonnenberg, H., and Wilson, D.R.:

The role of the medullary collecting ducts in postobstructive diuresis.

J.clin.Invest. 57: 1564 - 1574, 1976

Stephenson, J.L.:

Concentration of urine in a central core model of the renal counterflow system.

Kidney Int. 2: 85 - 94, 1972

Sturm, W.:

Verbesserung der postobstruktiven Nierenfunktion durch Blockade der Thromboxansynthese.
Experimentelle Untersuchungen bei Hunden mit kompletter einseitiger Harnstauung.
Habilitationsschrift LMU, München 1986

Thirakomen, K., Kozlov, N., Arruda, J.A.L., Kurtzman, N.A.:
Renal hydrogen secretion after release of unilateral ureteral obstruction.
Am.J.Physiol. 231: 1233 - 1239, 1976

Toretti, J., Hendler, E., Weinstein, E., Longnecker, R.E., and Epstein, F.H.:
Functional significance of Na-K-ATPase in the kidney: effects of ouabain inhibition.
Am.J.Physiol. 222:1398 - 1405, 1972

Toyoda, Y.:

A new technique for catheterless cutaneous ureterostomy.
J.Urol. 117: 276, 1977

Vaughan, E.D.Jr., Sorenson, E.J., Gillenwater, J.Y.:
The renal hemodynamic response to chronic unilateral complete ureteral occlusion.
Invest.Urol. 8: 78 - 90, 1970

Wald, H., Epstein, F.H., Popovtzer, M.M.:
Effect of chronic salt loading on renal Na-K-ATPase activity in the rat.
Proc.Exp.Biol.Med. 172: 291 - 296, 1982

Wald, H., and Popovtzer M.M.:
Renal Function and Na-K-ATPase in Rats after Suprarenal Ligation of Inferior Vena Cava.
Pflügers Arch. 394: 165 - 173, 1982

Weinmann, E.J., Renquist, K., Stroup, R., Kashgarian, M., Hayslett, J.P.:
Increased tubular reabsorption of sodium in compensatory renal growth.
Am.J.Physiol. 224: 565 - 571, 1973

Wieland, W.-F.:

Vergleichende physiologische und nuklearmedizinische Untersuchungen über den Zeitverlauf der Funktionsänderung und die funktionelle Regenerationsfähigkeit der unilateralen Harnstauungsniere des Hundes.

Habilitationsschrift LMU, München 1985

Williams, R.D., Fanestil, D.D., and Blackard, C.E.:

Etiology of postobstructive diuresis: ouabain-sensitive adenosine triphosphatase deficit and elevated solute excretion in the postobstructed dog kidney.

Invest.Urol. 14: 148 - 152, 1976

Wilson, D.R.:

Pathophysiology of obstructive nephropathy.

Kidney Int. 18: 281 - 292, 1980

Wilson, D.R.:

Renal function during and following obstruction.

Ann.Rev.Med. 28: 329 - 339, 1977

Wilson, D.R., Honrath, U.:

Nephron functional heterogeneity in the postobstructive kidney.

Kidney Int. 7: 19 - 26, 1975

Wilson, D.R., Knox, W., Hall, E., and Sen, A.K.:

Renal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase deficiency during post-obstructive diuresis in the rat.

Can.J.Physiol.Pharmacol. 52: 105 - 113, 1974

Wilson, D.R., Knox, W.H., Sax, J.A., and Sen A.K.:

Post-Obstructive Nephropathy in the Rat. Relationships between Na-K-ATPase Activity and Renal Function.

Nephron 22: 55 - 62, 1978

Yarger, W.E., and Griffith, L.D.:

Intrarenal hemodynamics following chronic unilateral obstruction in the dog.

Am.J.Physiol. 227: 816 - 826, 1974

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Doktorvater, Herrn Professor Dr. W. Sturm für die Überlassung des Themas und die Anleitung zu selbständigem wissenschaftlichem Arbeiten. Seine selbstverständliche Bereitschaft, anstehende Probleme jederzeit im persönlichen Gespräch zu diskutieren, war bei der Durchführung der Arbeit sehr hilfreich.

Herrn Professor Dr. W. Brendel danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut für Chirurgische Forschung der Universität München.

Herrn Professor Dr. A. Baethmann und seinem Team gebührt mein Dank für die herzliche Aufnahme.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. E. Erdmann (Medizinische Klinik I des Klinikums Großhadern) und seiner Forschungsgruppe für die guten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor, sowie hilfreiche Anregungen.

Meinem Mitdoktoranden Herrn Othmar Seemann danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bei den durchgeführten Untersuchungen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Straub
Vorname	Thomas
Geburtsdatum	13.12.1960
Geburtsort	Marktoberdorf/Ostallgäu
Vater	Sebastian Straub, Landwirt
Mutter	Rosa Straub, geb. Euband, Hausfrau
Familienstand	verheiratet
Ehefrau	Lisbeth Straub, geb. Baumgartner
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch

Ausbildungsdaten:

09/1967-07/1971	Grundschule Stötten
09/1971-06/1980	Gymnasium in Marktoberdorf
27. Juni 1980	Abitur
1.7.1980-14.4.1981	Wehrdienst: GebInstKp 220 Füssen
05/1981-05/1987	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
12. Mai 1987	III. Staatsexamen
25. Mai 1987	Approbation als Arzt
21./22. Juli 1987	Amerikanisches Examen
seit 1. Juni 1987	Assistenzarzt an der Abteilung für Allgemeine Chirurgie der Universität Ulm

